



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Efecto de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus L.*  
“alcachofa” en la producción de bacteriocinas por  
*Lactobacillus spp.***

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Nicky Rider DELAO LIZARDO

**ASESORES**

Mafalda Nancy LOZANO REYES

Gladys Constanza ARIAS ARROYO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Delao N. Efecto de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* L. “alcachofa” en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus spp.* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2016.

---

1095

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
DECANATO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

13(2)  
69

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Efecto de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* L. "alcachofa" en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus spp*"

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

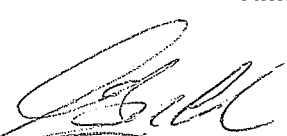
NICKY RIDER DELAO LIZARDO


Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la SUSTENTACIÓN de la TESIS, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación ha obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE 17


en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 09 de setiembre del 2016

  
Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera  
Presidente

  
Q.F. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes  
Miembro

  
Mg. Carmen-Rosa Arana Ávila  
Miembro

  
Ing. Roberto Jhalver Vega Paulino  
Miembro

FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Calle N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú  
Tel: (511) 328-4737 / 328-4739 Fax: (511) 619-7000 anexo 4819 Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe



## **DEDICATORIA**

A mi familia numerosa, papá, mamá y mis seis hermanos, que con las ganas, el esfuerzo constante y dedicación puestas en mí desde un principio, hoy se llega a culminar este proyecto, gracias por todo lo que han dado por mí y por el futuro que me espera, que ustedes han contribuido y del que formarán parte. Gracias por confiar siempre en mí y este y otros resultados alcanzados es de ustedes y para ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Nancy Lozano Reyes** por la oportunidad que me dio de que asesorara mi tesis y con ello contribuir con nuevos conocimientos para la profesión del Químico Farmacéutico.

A la **Dra. Gladys Arias Arroyo** por el apoyo continuo y por el co-asesoramiento y a la vez guía del proyecto de tesis.

Al **Q.F. Nelson Bautista Cruz** y **Q.F. Robert Almonacid** por su apoyo constante y por aclarar las dudas del proyecto, por la paciencia y el tiempo dedicado cuando lo requería.

A la Q.F. **Claudia Rosillo Zevallos**, por su amor, amistad, motivación y apoyo incondicional durante todo el proceso de la realización de esta investigación.

A mi amiga y colega **Karen Cárdenas Toribio**, por el apoyo en la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del Jurado calificador por las correcciones y aportes: Dr. Pablo Bonilla Rivera, QF. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes, Mg. Carmen Arana Ávila y el Ing. Roberto Vega Paulino.

## ÍNDICE

### INDICE DE TABLAS

### INDICE DE FIGURAS

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
1.2. Hipótesis	3
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1. <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”	5
2.1.1. Clasificación taxonómica	4
2.1.2. Descripción morfológica	5
2.1.3. Zonas de cultivo y producción en el Perú	6
2.1.4. Composición química	8
2.1.5. Usos tradicionales	9
2.1.6. Propiedades de la alcachofa	10
2.2. Fructooligosacáridos	10
2.2.1. Bioquímica de los fructooligosacáridos	10
2.2.2. Propiedades fisicoquímicas básicas	12
2.2.3. Fuente de los fructooligosacáridos	12
2.2.4. Efecto prebiótico de los fructooligosacáridos	13
2.2.5. Propiedades beneficiosas de los FOS para la salud	13
2.3. Probióticos	14

2.4. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	16
2.4.1. Definición y características	16
2.4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	17
2.4.3. Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas	20
2.5. Bacteriocinas	18
2.5.1. Definición	18
2.5.2. Características	19
2.5.3. Clasificación	19
2.5.4. Mecanismo de acción de las bacteriocinas	20
2.5.5. Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas	21
2.5.6. Aplicaciones de las bacteriocinas	22
2.6. Métodos de evaluación antimicrobiana	22
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1. Materiales y equipos	24
3.1.1. Materiales	24
3.1.2. Equipos	25
3.1.3. Reactivos	26
3.2. Métodos	26
3.2.1. Material botánico	26
3.2.2. Material biológico	27
3.2.3. Lugar de ejecución	27
3.2.4. Recolección y transporte de la muestra	27
3.2.5. Selección y acondicionado de la muestra	27
3.2.6. Estudio Químico Bromatológico	28
3.2.6.1. Humedad	31



3.2.6.2.	Proteínas totales	28
3.2.6.3.	Cenizas	29
3.2.6.4.	Carbohidratos	29
3.2.6.5.	Azúcares reductores directos y totales	29
3.2.6.6.	Grasas	29
3.2.6.7.	Fibra cruda	29
3.2.6.8.	pH	30
3.2.7.	Extracción y cuantificación de fructooligosacáridos	30
3.2.8.	Análisis microbiológicos	32
3.2.8.1.	Efecto de los FOS sobre el crecimiento de <i>Lactobacillus</i>	32
3.2.8.2.	Producción de bacteriocinas	34
3.2.8.3.	Determinación de la actividad antimicrobiana	34
3.2.8.4.	Prueba de actividad antimicrobiana: Método de Difusión en agar	34
3.2.8.5.	Evaluación fisicoquímica de las bacteriocinas	35
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	36
4.1.	Estudio Químico Bromatológico	36
4.2.	Extracción y determinación de fructooligosacáridos	37
4.3.	Análisis microbiológico	38
4.3.1.	Efecto de los FOS sobre la población de <i>Lactobacillus plantarum</i>	38
4.3.2.	Obtención del extracto proteico (bacteriocinas)	42
4.3.3.	Determinación de actividad antimicrobiana	42
4.3.4.	Prueba de actividad antimicrobiana: Método de difusión en agar	45
4.3.5.	Evaluación fisicoquímica de las bacteriocinas	48

<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>54</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

	N° Pág.
<b>Tabla 1.</b> Principales especies bacterianas usadas como probióticos.	14
<b>Tabla 2.</b> Probióticos con efectos beneficiosos sobre la salud, demostrados mediante ensayos clínicos en humanos.	15
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para extracción y cuantificación de los fructooligosacáridos (FOS) de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”.	31
<b>Tabla 4.</b> Composición Químico Bromatológico de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” en muestra fresca y muestra seca.	37
<b>Tabla 5.</b> Contenido de Fructooligosacáridos (FOS) en <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”.	38
<b>Tabla 6.</b> Evaluación de la absorbancia por efecto de diferentes concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	39
<b>Tabla 7.</b> Evaluación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de <i>L. plantarum</i> por efecto de diferentes concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> “alcahofa”.	42
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los fructoligosacáridos (2 %) sobre la población de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 21 y 24 horas.	43
<b>Tabla 9.</b> Evaluación de pH por efecto de diferentes concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	41

<b>Tabla 10.</b> Evaluación de absorbancia, UFC y pH por efecto de 2% de FOS de <i>Cynara scolymus</i> sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	42
<b>Tabla 11.</b> Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de <i>L. plantarum</i> frente al microorganismo patógeno <i>Escherichia coli</i> .	46
<b>Tabla 12.</b> Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de <i>L. plantarum</i> frente al microorganismo patógeno <i>Staphylococcus aureus</i>	46
<b>Tabla 13.</b> Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de <i>L. plantarum</i> frente al microorganismo patógeno <i>Bacillus subtilis</i> .	47
<b>Tabla 14.</b> Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de <i>L. plantarum</i> frente al microorganismo patógeno <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
<b>Tabla 15.</b> Halos de inhibición obtenidos en las pruebas de evaluación fisicoquímica de bacteriocinas de <i>Lactobacillus plantarum</i> .	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

	N° Pág.
<b>Figura 1.</b> Alcachofa: Superficie cosechada (Ha) y producción (TM) en el Perú (2000 – 2009).	6
<b>Figura 2.</b> Plantación (a) y la inflorescencia (b) de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” en la provincia de Huaral.	7
<b>Figura 3.</b> Capítulo de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”.	8
<b>Figura 4.</b> Fruto de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” (a) y Corte transversal del fruto de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” (b).	8
<b>Figura 5.</b> Parte comestible de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa” (a) y las brácteas (b).	9
<b>Figura 6.</b> Estructura de los fructooligosacáridos: (a) Fructosil – nistosa; (b) kestosa; (c) Nistosa.	11
<b>Figura 7.</b> Estructura de la nisina. Donde: Abu = ácido aminobutírico; Dha= ácido dehidroalanina; Ala-S-Ala = lantionina; Dhb = dehidrobitirina ( $\beta$ -metildehidroalanina); Abu-S-Ala = metillantionina	20
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo del proceso de extracción de fructooligosacáridos contenidos en <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”.	31
<b>Figura 9.</b> Diagrama para el estudio químico bromatológico, extracción y cuantificación de fructooligosacáridos de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”.	32

<b>Figura 10.</b> Diagrama para las metodologías de la extracción y cuantificación de fructooligosacáridos, y los análisis microbiológicos de <i>Cynara scolymus</i> “alcachofa”.	33
<b>Figura 11.</b> Evaluación de la absorbancia por efecto de diferentes concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	39
<b>Figura 12.</b> Evaluación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de <i>L. plantarum</i> por efecto de diferentes concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i>	40
<b>Figura 13.</b> Evaluación de pH por efecto de diferentes concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	41
<b>Figura 14.</b> Evaluación de absorbancia y tiempo por efecto de 2% de concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	44
<b>Figura 15.</b> Evaluación de UFC y tiempo por efecto de 2% de concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	44
<b>Figura 16.</b> Evaluación de pH y tiempo por efecto de 2% de concentraciones de FOS de <i>Cynara scolymus</i> sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .	45

## RESUMEN

Los fructooligosacáridos son oligosacáridos de fructosa que entre otras propiedades, son prebióticos, y están presentes en muchas especies vegetales, entre las que se encuentra la *Cynara scolymus* “alcachofa”; entre tanto, las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana que son producidas por diferentes cepas bacterianas, entre las que destacan las bacterias ácido lácticas (BAL).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) extraídos de *Cynara scolymus* “alcachofa” sobre la población de *Lactobacillus plantarum* y el efecto sobre la producción de bacteriocinas. La extracción de FOS de *Cynara scolymus* es mayor a 80 °C durante 60 minutos. Se observó que al 2 % el fructooligosacáridos (FOS) de *Cynara scolymus* “alcachofa” tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la población de *Lactobacillus plantarum*, y la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum*, presentan actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, asimismo presentan estabilidad frente a la temperatura de 60°C, 80°C y 90°C y frente a la prueba de catalasa.

**Palabras clave:** bacteriocinas, bacterias ácido lácticas, fructooligosacáridos, prebióticos.

## ABSTRACT

Fructooligosaccharides are fructose oligosaccharides that among other properties, are prebiotics, and are present in many plant species, among which is the *Cynara scolymus* "artichoke"; meantime, bacteriocins are peptidic substances with antimicrobial activity that are produced by different bacterial strains, among which lactic acid bacteria (LAB).

In this study the effect of fructooligosaccharides (FOS) extracted from *Cynara scolymus* "artichoke" on the population of *Lactobacillus plantarum* and the effect on the production of bacteriocins are evaluated. FOS extraction of *Cynara scolymus* is greater at 80 ° C for 60 minutes. It was noted that the 2% fructooligosaccharides (FOS) of *Cynara scolymus* "artichoke" has a positive effect on the growth of the population of *Lactobacillus plantarum*, and production of bacteriocins. Bacteriocins of *Lactobacillus plantarum*, has antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, also exhibit stability against temperature of 60 ° C, 80 ° C and 90 ° C and facing the catalase test.

**Keywords:** bacteriocins, lactic acid bacteria, fructooligosaccharides, prebiotic.



## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores se encuentran más interesados en adquirir productos naturales, con un mayor valor nutricional y un menor contenido de aditivos químicos.

En los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de estrategias que permitan manipular la microbiota presente en el intestino grueso humano con el propósito de favorecer el crecimiento de microorganismos con efectos beneficiosos para la salud, reduciendo el riesgo a contraer enfermedades por la presencia de microorganismos patógenos. En consecuencia se ha propuesto el consumo de prebióticos, probióticos y su combinación (simbióticos).

Una de las estrategias de defensa más antigua que se ha conservado a través del tiempo en los organismos eucariotas es la producción de péptidos con actividad antimicrobiana. Estos péptidos, además de sus efectos antimicrobianos directos sobre los microorganismos invasores, actúan como moduladores de la respuesta del sistema inmune innato promoviendo el reclutamiento y la acumulación de células de defensa en los sitios de inflamación (ej. células T y células dendríticas), incrementan la fagocitosis, inducen la reparación de heridas y promueven la activación de la respuesta adaptativa. Un ejemplo de estas moléculas son las defensinas  $\alpha$ , producidas por neutrófilos del intestino delgado de humanos cuya función es reforzar las barreras de la mucosa intestinal. Sin embargo, la producción de los péptidos antimicrobianos no se limita sólo a eucariotas, ya que se han identificado también en bacterias y son denominados bacteriocinas, y se ha observado

que algunas de estas moléculas poseen mayor actividad que los péptidos antimicrobianos producidos por los eucariotas.<sup>1</sup>

Las bacteriocinas son proteínas producidas por bacterias de una determinada cepa y que es activa frente a otras cepas estrechamente relacionadas<sup>2</sup>, generalmente reconocidas como compuestos “naturales” capaces de influir en la seguridad y calidad de los alimentos. Son sustancias peptídicas biológicamente activas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes bacterias, son resistentes al calor e hidrolizadas por el jugo gástrico, lo que permite su utilización como conservantes naturales en alimentos. Existen numerosas bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de bacteriocinas y, cada una con espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas en diversas formas. La fibra es un nutriente esencial en una dieta saludable, contribuyendo al mantenimiento de la salud y previniendo la aparición de distintas enfermedades.

La clasificación de la fibra en base a su grado de fermentación en el colon, la divide en dos tipos diferenciados, fibra totalmente fermentable y fibra parcialmente fermentable. Además de los efectos conocidos de la fibra en la regulación del tránsito y ritmo intestinal, el avance durante los últimos años en el conocimiento del metabolismo de algunas fibras fermentables, como los fructooligosacáridos (además de la inulina y los galactooligosacáridos), ha puesto de manifiesto su efecto prebiótico<sup>3</sup>. Los prebióticos son sustancias alimenticias que nutren a un grupo selecto de microorganismos que pueblan el intestino grueso y que favorecen la multiplicación de las bacterias beneficiosas<sup>4</sup>, uno de los prebióticos son los fructooligosacáridos.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo general**

- Determinar el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) de *Cynara scolymus* L. “alcachofa” en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus spp.*

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Extraer los fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* “alcachofa”
- Determinar el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) de *Cynara scolymus* “alcachofa” en la población de *Lactobacillus*.
- Determinar el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) de *Cynara scolymus* “alcachofa” en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus spp.*
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de bacteriocinas frente a microorganismos patógenos específicos.

## **1.2. HIPÓTESIS**

La adición de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* “alcachofa” en los medios de cultivo de *Lactobacillus spp.* favorece en la población y la producción de bacteriocinas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Cynara scolymus* “alcachofa”

La *Cynara scolymus* “alcachofa” es una planta herbácea originaria de la región del mediterráneo (Asia menor y norte de África) y el sur de Europa, parece ser que el cultivo y selección fue durante la Edad media, quedando las mejores en España e Italia, de allá fue introducida a Inglaterra (1548) y a los Estados Unidos (1806), entre tanto, en el hemisferio sur, solo figuran como productores Argentina, Chile y Perú.

Etimológicamente parece derivar de la palabra árabe que significa “lenguetas de la tierra”, en referencia a sus singulares hojas, justamente, fueron los árabes quienes extendieron el cultivo a Europa, mejoraron las variedades y sus cualidades gastronómicas.<sup>5</sup>

#### 2.1.1. Clasificación taxonómica

La muestra se clasificó por el Museo de Historia Natural (UNMSM – 2016), según el sistema de clasificación de Cronquist (1988), *Cynara scolymus* tiene la siguiente clasificación:

- **Reino** : Plantae
- **División** : Magnoliophyta
- **Clase** : Magnoliopsidae
- **Sub-clase** : Asteridae
- **Orden** : Asterales
- **Familia** : Asteraceae
- **Género** : *Cynara*
- **Especie** : *Cynara scolymus* L.

### 2.1.2. Descripción morfológica

La *Cynara scolymus* “alcachofa” es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia Asteraceae. Es una gimnosperma dicotiledónea, robusta y perenne, de polinización cruzada, posee un genoma diploide con 34 cromosomas en total. La planta crece hasta una altura de 1 m – 1,5 m o más y cubre un área de 1,5 m – 2 m aproximadamente de diámetro; de color verde plateado. Estas y otras características varían dependiendo de la variedad de alcachofa.

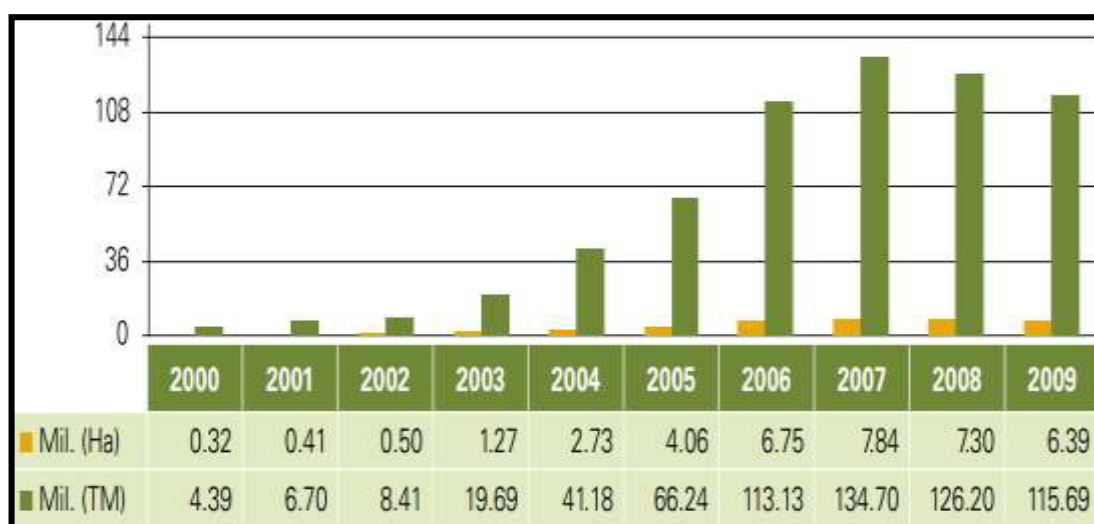
Como alimento, la alcachofa es nutritiva y saludable, recomendado en dietas para disminuir peso, colesterol, y retención de líquidos puesto que es baja en grasas, sodio y carbohidratos. Contiene proteínas, calcio, hierro, fósforo y vitaminas A, E B1, B2 y C.<sup>6</sup>

Las flores, que aparecen en el segundo año, se encuentran agrupadas en capítulos gruesos de 10 - 15 cm de diámetro, insertas sobre tallos fuertes, ramificados, acalanados, con hojas sésiles, casi enteras; de color violetas, estas flores son tubulosas y se encuentran insertas en un receptáculo carnoso rodeado de brácteas, también carnosas en su base que no terminan en punta.<sup>7</sup>

El capítulo o cabezuela, que pueden ser alargado o achatado, formando un rosetón, con hojas (brácteas) verdes o moradas (debido al contenido de antocianinas) unidas en la base o receptáculo y que va a continuación al tallo; estas brácteas son erectas, tiernas y carnosas en el interior, el receptáculo y las hojas interiores son comestibles y se recolectan antes de iniciado el florecimiento, iniciado éste pierde todo su valor comestible.<sup>8</sup>

### 2.1.3. Zonas de cultivo y producción en el Perú

Perú es un país con una gran biodiversidad en el mundo y cuenta con recursos naturales para la producción, ello debido a las condiciones naturales, gran diversidad de ecosistemas, suelos, climas, disponibilidad de recursos hídricos, etc. Las principales zonas de cultivo de alcachofa son Cajamarca, La Libertad, Ancash, Junín, Huancavelica, Lima, Ayacucho e Ica, que exportan a mercados internacionales de Estados Unidos, España, Francia y Alemania, con lo que en el 2011 se exportó en 39972 toneladas, cuya cifra alcanzó los 133 millones de dólares, mientras que en el 2010 se exportó 127 503 toneladas, que alcanzó una cifra de 97 millones de dólares.<sup>9</sup>



**Figura 1.** Alcachofa: Superficie cosechada (Ha) y producción (TM) en el Perú (2000 – 2009).<sup>10</sup>

### 2.1.4. Composición química

La alcachofa es importante en la dieta de una persona, pues además de nutritivas tienen un efecto diurético, el agua es uno de los componentes mayoritarios, junto con los hidratos de carbono, así mismo, contiene minerales

como sodio y potasio, fósforo y calcio, en cuanto a vitaminas destaca por su contenido de las vitaminas B1, B3 y pequeñas cantidades de vitamina C y ácido fólico.<sup>11</sup>

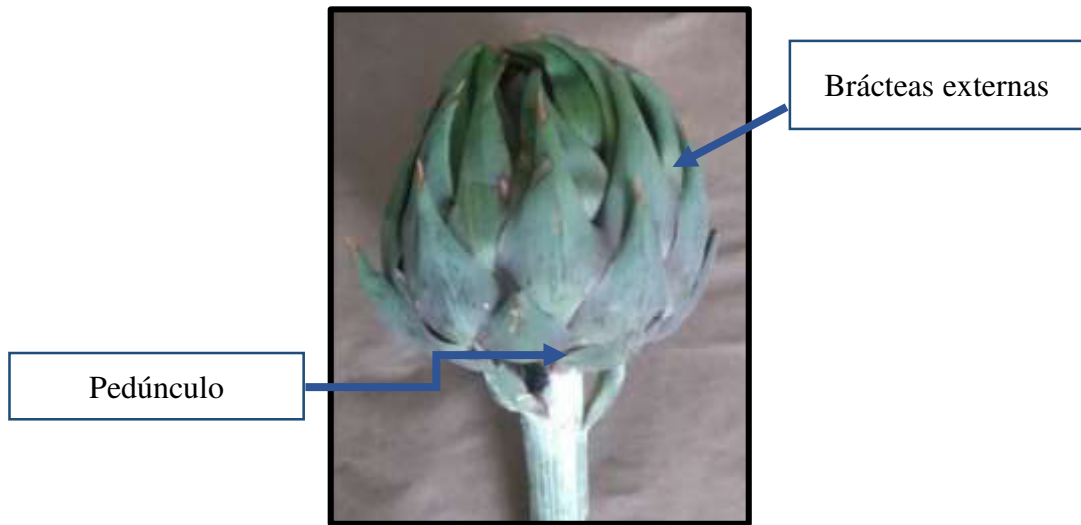
*Cynara scolymus* “alcachofa” contiene proteínas, minerales, una baja cantidad de lípidos, fibra dietética y una alta proporción de compuestos fenólicos.<sup>12</sup> Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran la cinarina (ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico), luteolina, cinarosida (luteolina-7-O-rutinósido), ácido cafeico, ácido cumárico, ácido hidroxicinámico, ácido ferúlico, derivados del ácido cafeoilquínico, ácido clorogénico; glucósidos flavonoides, etc.<sup>13</sup>



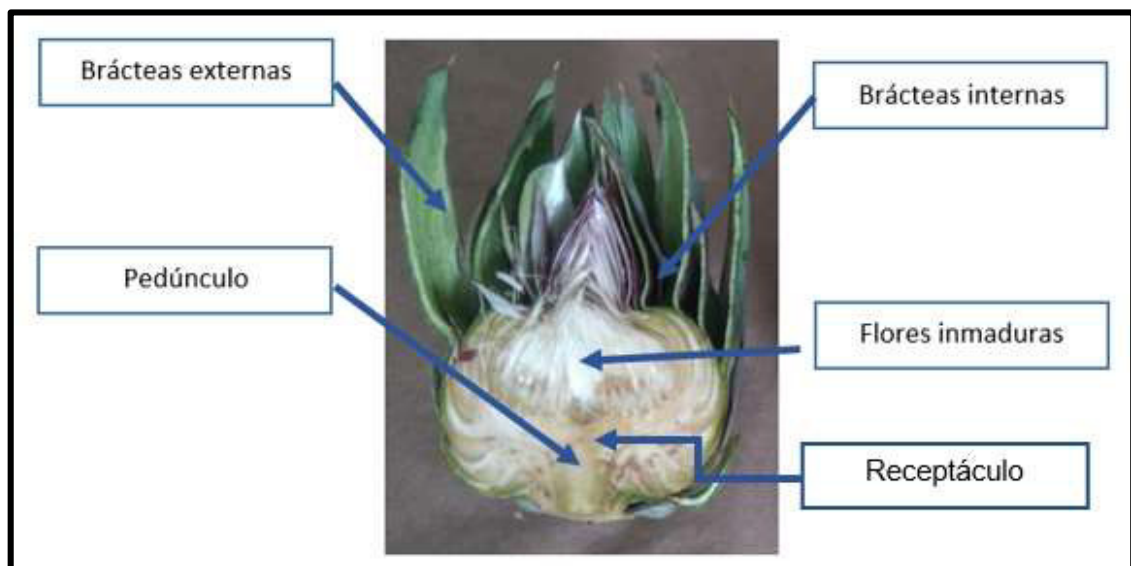
(a)

(b)

**Figura 2.** Plantación (a) y la inflorescencia (b) de *Cynara scolymus* “alcachofa” en la provincia de Huaral.



**Figura 3.** Brácteas externas y pedúnculo de *Cynara scolymus* “alcachofa”.



**Figura 4.** Corte transversal del fruto de *Cynara scolymus* “alcachofa”.





(a)



(b)

**Figura 5.** Parte comestible de *Cynara scolymus* “alcachofa” (a) y las brácteas (b)

#### **2.1.5. Usos tradicionales**

Gracias a su contenido de vitaminas y hierro, la alcachofa, tomada con jugo de limón o de tomate, es considerada como un excelente alimento medicinal para personas con diabetes, anemia y enfermos del hígado. La decocción de las raíces se usa como febrífugo y para aliviar las afecciones hepáticas. La decocción del receptáculo, incluidas las brácteas, se utiliza como tónico ferruginoso y como poderoso depurador de la sangre, es especialmente usada para fortalecer personas débiles, raquíticas o anémicas; se dice que las frotaciones con esta decocción alivian el reumatismo y el dolor de los riñones. La decocción de las hojas, con jugo de limón, se utiliza como reconstituyente hepático y para favorecer el flujo biliar. Se usa como antidiarreico, antidiabético, antiasmático, antirreumático, depurador de la sangre, colerético, tónico, diurético. El jugo fresco de las hojas se utiliza externamente para el tratamiento del acné, eczemas y erupciones cutáneas.<sup>14</sup>

### **2.2.6. Propiedades de la alcachofa**

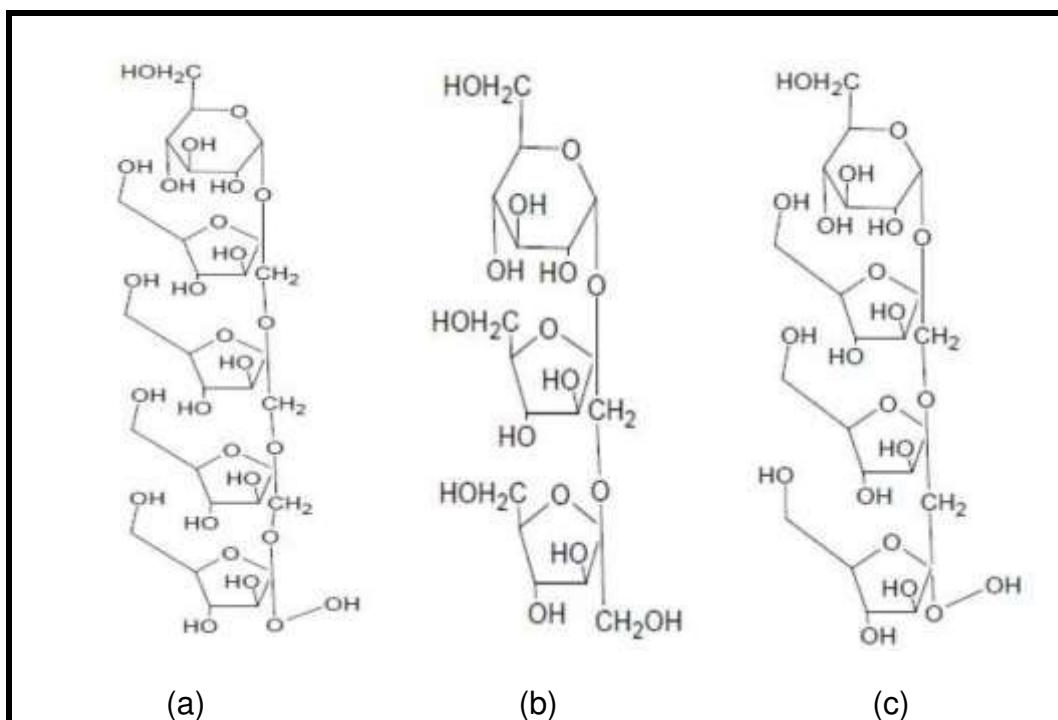
Los ensayos clínicos han demostrado que *Cynara scolymus* “alcachofa” posee propiedades antidiabéticas, efecto hipolipemiante, inhibe la oxidación de las LDL, reducción de las especies reactivas de oxígeno intracelulares por LDL oxidada en células endoteliales y monocitos.<sup>15</sup> La alcachofa contiene numerosos compuestos químicos de reconocida actividad farmacológica, tales como hepatoprotectora, colerética, diurética, antioxidante, entre otras.<sup>16</sup>

## **2.2. Fructooligosacáridos**

Son oligosacáridos de fructosa y están conformados por porciones lineales de moléculas de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-1) y solo contienen un residuo de glucosa en el extremo reductor de la molécula y se encuentra unida a la cadena principal, a través de un enlace glucosídico  $\alpha$  (1-2); además, presenta diferente grado de polimerización (GP), peso molecular (PM), estructura y, por lo tanto, poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales.

### **2.2.1. Bioquímica de los fructooligosacáridos**

Los fructooligosacáridos (FOS) poseen una cadena lineal corta, cuya estructura química está compuesta por una molécula de glucosa unida a dos o más moléculas de fructosa. Esta unión se lleva a cabo por enlaces 1,2 $\alpha$  (glucosa – fructosa) y enlaces  $\alpha$ -2,1 (fructosa – fructosa) dando origen a 1 – kestosa (GF2), nistosa (GF3) y 1F – fructofuranosilnistosa (GF4). Los FOS constituyen por ejemplo, los principales compuestos de reserva energética en los agaves.<sup>18</sup>



**Figura 6.** Estructura de los fructooligosacáridos: (a) Fructosil – nistosa; (b) kestosa; (c) Nistosa.<sup>19</sup>

Los FOS pueden ser producidos por varias bacterias, hongos (por ejemplo *Aspergillus niger*) y algunas especies de plantas donde cumplen diferentes funciones, en plantas son sintetizados por el almacenamiento de carbohidratos a largo y corto plazo. En bacterias son producidos como parte de los exopolisacáridos, tienen una alta masa molecular y son casi en todos los casos de tipo levana; estos, al igual que los hongos son sintetizados por la secreción de enzimas que usan sacarosa como sustrato para realizar la transferencia fructosil aumentando el tamaño de la cadena.<sup>20</sup>

En términos generales, los FOS pueden ser obtenidos por hidrólisis de la inulina, usando una endoinulinasa, o por síntesis usando la  $\beta$  – fructofuranosidasa (EC3.2.1.26, EC2.4.1.9). El FOS obtenido a partir de la

sacarosa tiene una cadena más corta que los de inulina, que tiene más poder edulcorante, y puede ser utilizado como edulcorante para diabéticos.<sup>21</sup>

### **2.2.2. Propiedades fisicoquímicas básicas**

El grado de polimerización de los fructooligosacáridos (GP) es menor a 10 unidades y, aquellos con un GP<5 unidades presentan un bajo poder endulzante y muy bajo aporte calórico.<sup>22</sup> Los pesos moleculares de los FOS son muy variables según la fuente, pero en términos generales varían entre 1000 y 4500 Da, los enlaces característicos  $\beta$  (2-1) son responsables de que los fructanos no sean digeribles, lo que a su vez tiene como consecuencia que tengan un bajo valor calórico; son totalmente solubles (a diferencia del almidón que es insoluble), de solubilidad apreciable en etanol 80 %, la viscosidad de las disoluciones de los fructanos son generalmente más altas que la de los demás carbohidratos y suelen ser de mayor estabilidad térmica (hasta temperaturas cercanas a 140 °C). Son fácilmente hidrolizables por acción de ácidos o enzimas, son muy estables a los rangos de pH encontrados en los alimentos (pH entre 4 y 7), así como estables a la refrigeración.<sup>23</sup>

### **2.2.3. Fuente de los fructooligosacáridos**

Entre las fuentes de los fructooligosacáridos se encuentran *Oxalis tuberosa* “oca”, *Smallanthus sonchifolius* “yacón”, *Manihot sculenta* “yuca o mandioca”<sup>24</sup> así como en la “achicoria”, “cebolla”, “ajo” y “alcachofa”<sup>25</sup>, los plátanos, puerros, trigos, tomates, espárragos, achicoria,<sup>26</sup> agaves,<sup>27</sup> etc.

#### **2.2.4. Efecto prebiótico de los fructooligosacáridos**

El término prebiótico se refiere a los ingredientes de los alimentos no digeribles que producen efectos beneficiosos sobre el huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon. Dentro de estos se encuentran por ejemplo, los fructooligosacáridos, inulina, galactooligosacáridos, oligosacáridos derivados de la soja, xilooligosacáridos, pirodextrinas e isomalto-oligosacáridos.<sup>28</sup> Los fructooligosacáridos (así como la inulina, GOS, lactulosa y almidón resistente) consumidos en pequeñas cantidades (5-20 g/día) estimulan el crecimiento tanto de bifidobacterias como lactobacilos.<sup>29</sup>

#### **2.2.5. Propiedades beneficiosas de los FOS sobre la salud**

La ingesta de los fructooligosacáridos en la dieta, además de ser un aporte de fibra dietética:<sup>30, 31,32</sup>

- Favorecen el crecimiento selectivo de las bacterias lácticas y *Bifidobacterium*.
- Capacidad de evitar el estreñimiento
- Reducción de riesgos asociados a la hiperglicemia
- Mejorar la absorción de minerales como calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre
- Tienen efectos beneficiosos sobre el metabolismo y la regulación de los niveles séricos de colesterol.
- Suplementos de FOS en infantes incrementa el contenido de bifidobacterias fecales.

### 2.3. Probióticos

Los profesionales de la salud están reconociendo cada vez más los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana. Estudios científicos recientes sobre las propiedades y la funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos desempeñan un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria, y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas en los niños y otros grupos de alto riesgo. Paralelamente, aumentó considerablemente el número y tipo de los alimentos y bebidas probióticas disponibles a los consumidores, sin embargo el uso de probióticos amerita indicar los regímenes de dosificación sobre la base de datos científicos.<sup>33</sup>

**Tabla 1.** Principales especies bacterianas usadas como probióticos.<sup>34</sup>

<b>Género <i>Lactobacillus</i></b>		<b>Género <i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Varios géneros</b>
<i>L. casei</i>	<i>L. lactis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. rhamosus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>B. breve</i>	<i>P. acidolacti</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetylactis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. johnsonii</i>	---	<i>O. formigenes</i>

Los probióticos pueden ejercer sus efectos beneficiosos bien directamente mediante la interacción de los microorganismos vivos con el hospedador, o bien indirectamente como resultado de la ingestión de metabolitos microbianos. Los mecanismos de acción son múltiples y cada microorganismo

y cepa puede tener funciones específicas. En la Tabla 2 se resumen los principales microorganismos probióticos y sus efectos más relevantes.<sup>35</sup>

**Tabla 2.** Probióticos con efectos beneficiosos sobre la salud, demostrados mediante ensayos clínicos en humanos.<sup>35</sup>

Microorganismos probióticos	Efectos beneficiosos Referencias
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tratamiento de la alergia.</li> <li>- Reducción de la diarrea por rotavirus</li> <li>- Reducción de la incidencia de la diarrea del viajero</li> </ul>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la diarrea asociada con antibióticos</li> </ul>
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la diarrea por rotavirus.</li> <li>- Inmunomodulación</li> </ul>
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la colonización por <i>Helicobacter pylori</i></li> </ul>
<i>Lactobacillus paracasei</i> 33	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prevención de rinitis alérgica</li> </ul>
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de los síntomas de colon irritable.</li> <li>- Reducción de enterocolitis recurrente por <i>Clostridium difficile</i>.</li> <li>- Reducción de los niveles de colesterol LDL</li> </ul>
<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la diarrea por rotavirus</li> </ul>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la diarrea por rotavirus.</li> <li>- Inmunomodulación.</li> <li>- Reducción de la inflamación por colon irritable.</li> <li>- Tratamiento y prevención de alergias</li> </ul>
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de los síntomas de colon irritable</li> </ul>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la incidencia de colon irritable</li> </ul>

## **2.4. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

### **2.4.1. Definición y características**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) abarcan un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen como una propiedad metabólica común la producción de ácido láctico como el producto final de la fermentación de hidratos de carbono. Las bacterias ácido lácticas son Gram (+), por lo general no móviles, no - esporulación, catalasa - negativos, organismos anaerobios facultativos tolerantes y tienen menos de 55% en moles de contenido de G + C en su ADN. A excepción de unas pocas especies, son organismos no patógenos con un estado generalmente reconocido como seguro reputado (GRAS).<sup>36</sup>

El grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) está formado por los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*; dicha clasificación corresponde a similitudes en las características morfológicas, metabólicas, fisiológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sales y en la tolerancia ácido – base.<sup>37</sup>

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de microorganismos que han sido utilizados en la manufactura de una gran variedad de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal, como queso, yogurt, masato, vino y chicha de jora. En este grupo se encuentran los lactobacilos, que producen sustancias metabólicas, tales como peróxido de hidrógeno, dióxido



de carbono, diacetilo, ácido láctico y bacteriocinas de gran importancia en el control de microorganismos indeseables en los alimentos.<sup>38</sup>

Diferentes estudios han aplicado la biopreservación mediante el uso de una microbiota natural como las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando las propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo como ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas. El uso de las bacteriocinas en la industria de los alimentos puede ayudar a reducir la adición de preservantes químicos así como también la intensidad del tratamiento térmico.<sup>39</sup>

#### **2.4.2. *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* es importante en muchas fermentaciones de alimentos, ya sea como un componente de la microflora natural o cuando se usa como un cultivo iniciador,<sup>40</sup> varias cepas de *L. plantarum* producen bacteriocinas, muchos de los cuales han sido aislados y caracterizados, dentro de estas bacteriocinas se encuentran las plantaricinas.

#### **2.4.3. Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL), constituyen un grupo bacteriano utilizado tradicionalmente en fermentaciones industriales de alimentos de origen lácteo, vegetal o cárnico; estos microorganismos contribuyen al desarrollo de aroma, sabor y textura de los productos fermentados. Sin embargo, su efecto no se limita a brindar una calidad sensorial determinada a los alimentos, sino que

las BAL son también responsables de su preservación, evitando el desarrollo de microorganismos contaminantes o patógenos,<sup>41</sup> cumpliendo una función de bioprotección, mejorar la calidad del alimento y la seguridad alimentaria.<sup>42</sup>

## **2.5. Bacteriocinas**

### **2.5.1. Definición**

Las bacteriocinas son definidas como péptidos que presentan propiedades antimicrobianas, capaces de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos. Siendo su principal función la defensa del huésped contra microorganismos patógenos. Las bacteriocinas se diferencian de los antibióticos en al menos dos características:

- Mientras las bacteriocinas son péptidos, los antibióticos son metabolitos secundarios.
- El espectro de inhibición de las bacteriocinas es estrecho ya que usualmente son activas contra microorganismos cercanos al microorganismo que las produce.

Las bacteriocinas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, de hecho, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies examinadas que abarcan los grupos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en las Arqueas.<sup>44</sup>

### **2.5.2. Características**

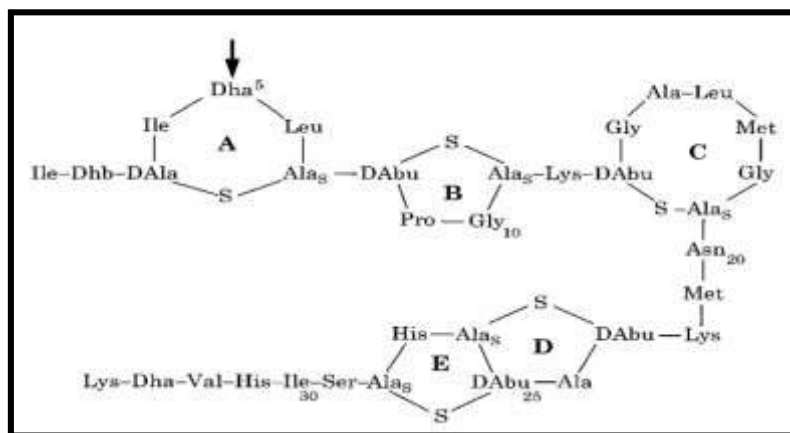
De forma general se pueden establecer una serie de características de las bacteriocinas producidas tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos. Dentro de estas se encuentra su síntesis en el ribosoma con tamaños de entre 30 y 40 aminoácidos y acción frente bacterias estrechamente relacionadas con el organismo productor aunque también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos. Adicionalmente, algunas bacteriocinas son estables al calor, activas en intervalos amplios de pH y fácilmente degradadas por proteasas intestinales, de esta manera, la gran mayoría de las bacteriocinas cumplen con las características que requiere un producto para utilizarse como bioconservador.

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram – positivas, que son más abundantes y poseen mayor diversidad estructural en relación con las producidas por otros grupos bacterianos, presenta un espectro de acción amplio y pueden inhibir el crecimiento de bacterias Gram – positivas y Gram – negativas, hongos, virus e incluso células eucariotas como eritrocitos humanos y bovinos.<sup>44</sup>

### **2.5.3. Clasificación**

Las bacteriocinas se pueden clasificar en dos clases separadas, en función de su estado de modificación: Clase I (Modificado) y Clase II (mínimamente modificado o cíclico):<sup>45</sup>

- a) **Clase I:** Se componen de todos los péptidos que se someten a una modificación post-traducciona durante la biosíntesis e incluyen la subclase de Lantibióticos. La nisina es la bacteriocina comercialmente más importante y es producida por *L. lactis* y es el prototipo de la clase I; otros miembros de este grupo incluyen a los lantibióticos lacticin, subtilina, etc.
- b) **Clase II:** Estables al calor y no son modificados, pueden subdividirse en cuatro subgrupos; IIa (pediocina), IIb, IIc y IId.



**Figura 7.** Estructura de la nisina. Donde: Abu = ácido aminobutírico; Dha= ácido dehidroalanina; Ala-S-Ala = lantionina; Dhb = dehidrobitirina ( $\beta$ -metildehidroalanina); Abu-S-Ala = metillantionina.<sup>46</sup>

#### 2.5.4. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Las bacteriocinas pueden ejercer sobre las células sensibles un efecto bactericida o bacteriostático, dependiendo de diversos factores como por ejemplo:<sup>47</sup>

- Dosis y el grado de purificación de la bacteriocina.
- El estado fisiológico de las células sensibles.

- Las condiciones ambientales, entre las que destacan la temperatura, el pH o la presencia de agentes u otros compuestos antimicrobianos que debiliten la pared o membrana celular de las células sensibles.

#### **2.5.5. Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas**

Existen numerosas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas y cada una de ellas exhibe un espectro de inhibición particular, algunas inhiben únicamente el crecimiento de cepas relacionadas taxonómicamente con la cepa productora, otras en cambio, inhiben un amplio rango de bacterias.<sup>48</sup> Entre los microorganismos productores de bacteriocinas se encuentran por ejemplo, *Lactococcus lactis* LMGT2081 que produce Lactococcin G, *Enterococcus faecalis* FAIR-E-309 productora de Enterocina 1071, *Lactococcus lactis* productora de Lactococcina Q, *Lactobacillus plantarum* C11 que produce las bacteriocinas plantaricina E/F y J/K, *Lactobacillus plantarum* LCP010 productora de plantaricina S, *Lactobacillus plantarum* NC8 que produce plantaricina NC8, *Streptococcus thermophilus* Sfi13 productora de thermophilina 13, *Streptococcus mutans* productora de mutacina IV, *Lactococcus lactis* 9B4 productora de lactococcina MN, *Lactobacillus casei* CRL 705 productora de Lactocina 705,<sup>49</sup> *Lactobacillus gasseri* LA39 que produce gassericina A, *Lactobacillus reuteri* LA6 productora de reutericina 6, *Lactobacillus acidophilus* M46 que produce acidocina B, *Bacillus subtilis* que produce subtilocina A,<sup>50</sup> *Lactococcus lactis* que producen Nisina A y nisina Z.<sup>51</sup>

### **2.5.6. Aplicaciones de las bacteriocinas**

Las halocinas (H4, Hal R1, Hal R2, H6, H1, S8 y C8) son un grupo de bacteriocinas producidas por arqueas halófilas, de entre ellas, las halocinas H4 y H6 son las más estudiadas. La halocina H6 es un inhibidor de la bomba de sodio/hidrógeno (Na/H) de células eucariotas, por lo que han sido demostradas su actividad in vitro en células de miocardio de animales y humanos.<sup>52</sup> así mismo, se emplean las bacteriocinas en forma de extracto (extracto crudo de bacteriocinas) producidas por *Bacillus cereus* P9, para la conservación de carnes y lechugas refrigeradas, con la finalidad de disminuir la cantidad de bacterias mesófilas y psicrotróficas en estos productos.<sup>53</sup> Se utilizan también en la conservación de hortalizas fermentadas, en la fermentación de las aceitunas, conservación de vegetales no fermentados, y agregados a alimentos como aditivos.<sup>54</sup> En la terapia del cáncer, algunas investigaciones indican que las bacteriocinas muestran actividad contra las células tumorales, , por lo que pueden ser potenciales candidatos a fármacos antitumorales, por ejemplo, las bacteriocinas como la colicina A y E1 (producidas por *Escherichia coli*) inhibieron el crecimiento de células tumorales humanas.<sup>43</sup>

### **2.6. Métodos de evaluación antimicrobiana**

Estas técnicas fueron desarrolladas al observar que los microorganismos eran capaces de inducir resistencia al antimicrobiano que se ha utilizado durante un periodo largo de tiempo, esta resistencia puede deberse a diversos factores como la producción de una sustancia que destruye el antibiótico,

adaptación del metabolismo bacteriano para inhibir el antibiótico, pared celular del microorganismo se vuelve impermeable al antibiótico, desaparición de cepas sensibles, producción de cepas mutantes, etc.<sup>55</sup>

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana, por ejemplo los métodos de difusión en disco (Kirby-Bauer), el método de pozos en agar y el método de dilución en tubos (turbidimétrico).<sup>56</sup>

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. MATERIALES Y EQUIPOS**

##### **3.1.1. Materiales**

- Beakers de 100, 250 mL (Pirex)
- Mortero
- Soporte universal
- Trípode
- Embudos de vidrio y plástico
- Cuchillo de acero inoxidable
- Placas Petri de 9 cm de diámetro
- Bureta de 50 mL (Pyrex)
- Tubos de ensayo x 20 mL
- Frascos de vidrio con tapa rosca
- Papel indicador
- Fiolas de 10, 25, 50, 100, 250 y 500mL
- Matraces Erlenmeyer de 100, 200 y 250 mL
- Probetas de 50 y 100 mL
- Placas de 9 cm de diámetro
- Papel filtro WHATMAN® N° 4
- Embudo Buchner
- Desecadores



### 3.1.2. Equipos

- Congeladora
- Balanza analítica OHAUS Modelo Pioner TM, escala: 0,1mg – 100
- Espectrofotómetro UV Marca GENESIS
- Equipo de Baño María digital, Sensibilidad 1°C, Rango de temperatura de 0 -100°C.
- Equipo de filtración al vacío Marca CPS PRO-SET
- Balanza analítica de 0,001 g de sensibilidad marca Henkel
- Estufa de secado. Rango: 20 – 200 °C
- Extractor de gases
- Cocinilla eléctrica
- Equipo de baño maría regulado a 70 +/- 2 °C
- Sistema extracción Soxhlet
- Termómetro, sensibilidad: 1 °C, escala: -10 – 150 °C
- Centrífuga, Marca PLC SERIES, Modelo PLC-05, 2000-8000rpm
- Digestor Kjeldahl, Marca Buchi, Modelo K-425
- Potenciómetro METTLER TOLEDO, Modelo MP120 FK, rango de medición 0.00 - 14.00, resolución 0.01
- Agitador de tubos (vortex), Marca Boeco Germany, Modelo XH-D
- Estufa de incubación para bacterias, Marca INCUCELL, Modelo LSIS-B2V/IC55, sensibilidad 0.1 °C.

### **3.1.3. Reactivos**

- Ácido clorhídrico q.p.
- Estándar de glucosa
- Hidróxido de sodio
- Mezcla de selenio
- Éter etílico
- Ácido sulfúrico q.p.
- Agar MRS Marca OXOID
- Caldo MRS Marca DIFCO
- Agar Muller Hinton (AMH) (Merck Millipore)
- Soluciones de Fehling A y Fehling B
- Agua destilada
- Azul de metileno 0,1 %
- Éter etílico p.a.
- Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N
- Hidróxido de sodio 2,5 N
- Catalasa (Sigma Aldrich)
- Pronasa E (Merck Millipore)

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Material botánico**

Receptáculo (parte comestible) de *Cynara scolymus* “alcachofa”

### **3.2.2. Material biológico**

El material biológico fue suministrado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

- *Lactobacillus plantarum*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus subtilis*

### **3.2.3. Lugar de ejecución**

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bromatología y en el Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **3.2.4. Recolección y transporte de la muestra**

Las muestras de *Cynara scolymus* “alcachofa” se recolectaron en la urbanización “El Trébol”, distrito de Huaral, provincia de Huaral, departamento de Lima, a una altitud de 188 msnm, en el mes de agosto.

### **3.2.5. Selección y acondicionado de la muestra**

Se realizó la selección de la muestra, para lo cual se consideró muestras libres de daños y abolladuras. Luego se separó las brácteas de la parte comestible

realizándose de forma manual, haciendo uso de cuchillos de acero inoxidable. Los ensayos del presente trabajo se realizaron en muestra estabilizada. Para la preparación de la muestra estabilizada, la parte comestible se cortó con un cuchillo en tamaños de 0,5 cm o menos, aproximadamente, luego se secó en una estufa con aire circulante a 45 °C hasta obtener un peso constante. La muestra seca se trituró con un molino de cuchillas, luego se guardó en bolsas con cierre ziploc hasta el momento de su uso en las pruebas. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta el momento de la preparación de la muestra.

### **3.2.6. Estudio Químico Bromatológico**

#### **3.2.6.1. Humedad**

**Método:** Gravimétrico (A.O.A.C.2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Pérdida de peso de la muestra por calentamiento en estufa a 105 °C hasta peso constante.

#### **3.2.6.2. Proteínas totales**

**Método:** Kjeldahl (A.O.A.C. 2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Digestión de la muestra en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> q.p., usando catalizadores, para liberar el nitrógeno de la proteína y retenerlo como sal de amonio. El nitrógeno es liberado en forma de NH<sub>3</sub> en un medio altamente básico, el cual es destilado y colectado en ácido de normalidad conocida, para su posterior titulación.

### **3.2.6.3. Cenizas**

**Método:** Calcinación directa (A.O.A.C. 2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Destrucción y volatilización de la materia orgánica formando residuos óxidos y sales minerales

### **3.2.6.4. Carbohidratos**

**Método:** Matemático (A.O.A.C. 2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Se obtiene por diferencia, restando el 100 % de la suma de proteínas, fibra cruda, extracto etéreo, cenizas y humedad.

### **3.2.6.5. Azúcares reductores directos y totales**

**Método:** Volumétrico de Lane y Eynon (A.O.A.C. 2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Propiedad de los azúcares de la muestra de reducir el cobre de la solución de Fehling en proporción volumétrica y formación de óxido cuproso en solución alcalina hirviente.

### **3.2.6.6. Grasas**

**Método:** Extracción continua en Soxhlet con éter etílico. (A.O.A.C. 2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Propiedad de la grasa de solubilizarse en solventes orgánicos, generándose una extracción hasta agotamiento.

### **3.2.6.7. Fibra cruda**

**Método:** Digestión ácida – alcalina (A.O.A.C. 2012)<sup>57</sup>

**Fundamento:** Mediante la digestión consecutiva con ácidos y álcalis diluidos en ebullición.

### 3.2.6.8. pH

**Método:** Potenciométrico<sup>58</sup>

**Fundamento:** Evaluación de las diferencias de potencial entre un electrodo previamente calibrados usando sus sales amortiguadoras.

### 3.2.7. Extracción y cuantificación de fructooligosacáridos

La extracción de fructooligosacáridos se basó en la solubilidad de estos compuestos en el agua,<sup>59</sup> además se evaluaron las condiciones de temperatura de extracción, proporción sólido: agua, tiempo de extracción<sup>60,61</sup> y la influencia de la agitación. Se evaluó la extracción en agua a una temperatura de 60 °C y 80 °C, en relación de 1:10 (sólidos/agua) durante 1 hora, luego se procedió con la centrifugación a 6000 rpm x 20 minutos. Posteriormente se separó el sobrenadante, se sometió a una hidrólisis química adicionando 10 mL de HCl 50 %, el cual es sometido a 80 °C en baño maría durante 2 horas y se cuantificó los azúcares reductores directos mediante el método de Lane y Eynon. Calculando FOS mediante la siguiente ecuación:<sup>60</sup>

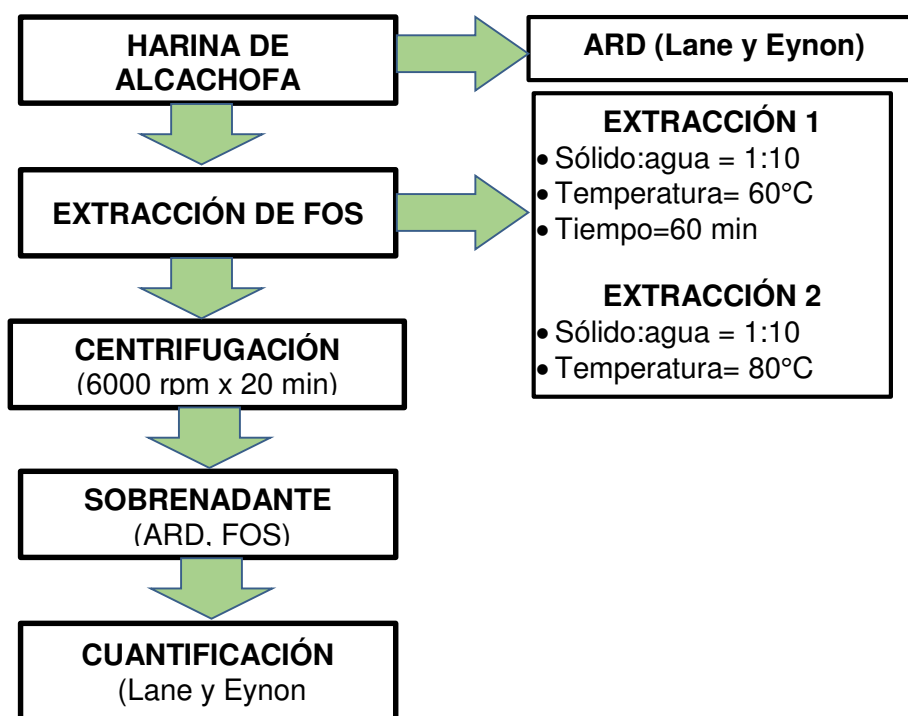
$$\text{FOS} = \text{ARD}_1 - \text{ARD}$$

Donde:

FOS = Fructooligosacáridos presentes en *Cynara scolymus* “alcachofa” (g%)

ARD = Azúcares reductores directos iniciales (g%)

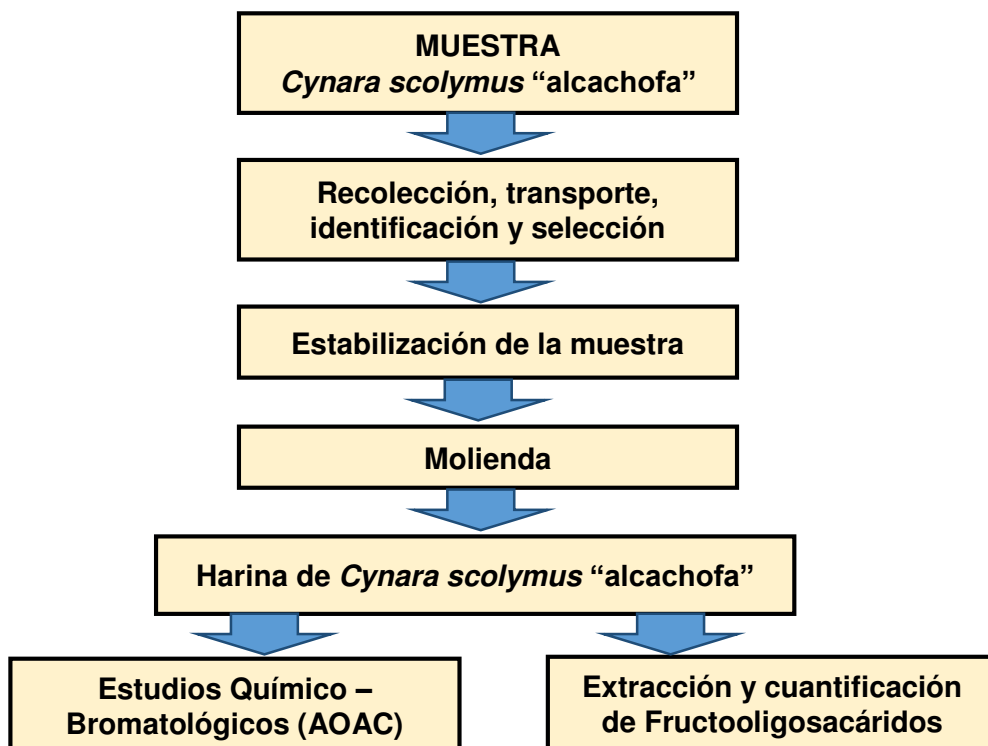
ARD<sub>1</sub> = Azúcares reductores directos después de la hidrólisis (g%)



**Figura 8.** Diagrama de flujo del proceso de extracción de fructooligosacáridos contenidos en *Cynara scolymus* “alcachofa”.

**Tabla 3.** Condiciones para extracción y cuantificación de los fructooligosacáridos (FOS) de *Cynara scolymus* “alcachofa”.

Extracción	60 °C	80 °C
Solvente	Agua	Agua
Tiempo	60 minutos	60 minutos
Centrifugación	6000 rpm x 20 min	6000 rpm x 20 min
Método Cuantificación	Lane y Eynon	Lane y Eynon



**Figura 9.** Diagrama para el estudio químico bromatológico, extracción y cuantificación de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* "alcachofa".

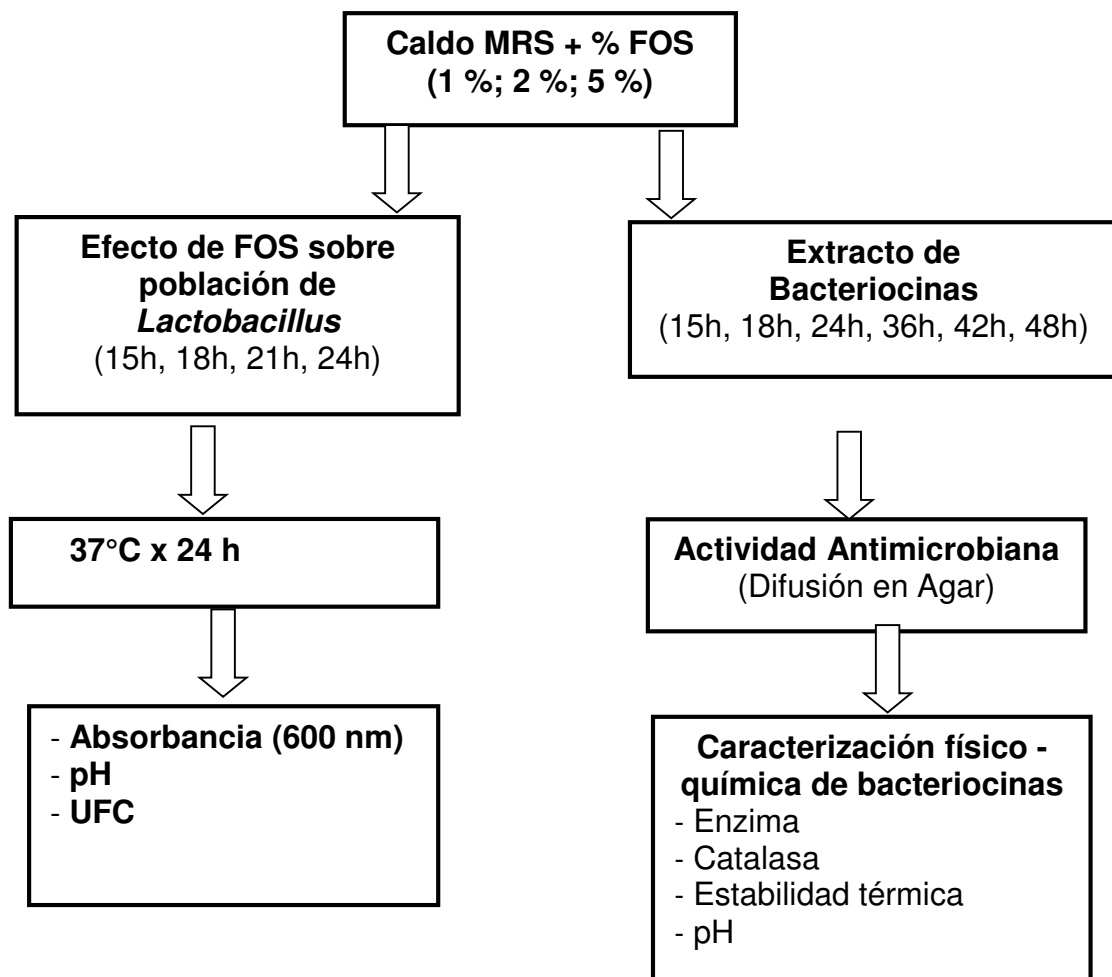
### 3.2.8 Análisis microbiológicos

#### 3.2.8.1 Efecto de los FOS sobre el crecimiento de *Lactobacillus*

El efecto de los fructooligosacáridos sobre la población de *Lactobacillus* se determinó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL, medición del pH y absorbancia a 600 nm. Para esto se prepararon 100 mL de caldo MRS como control y 100 mL de caldo MRS modificado con concentración de FOS (1 %, 2 % y 5 %). A cada uno de los matraces se agregó 100 uL de inóculo de *Lactobacillus plantarum* obtenido mediante dilución en cloruro de sodio 0,9 % y de densidad óptica ajustada a 0,1; posteriormente se cultivaron e incubaron a 37 °C durante 24 horas.



Se tomaron muestras de cultivo a las 0, 15, 18, 21 y 24 horas, y se monitoreó el crecimiento bacteriano determinando la absorbancia a 600 nm y el pH en cada tiempo, así mismo, se tomaron alícuotas de 1 mL de cada concentración, las cuales se usaron en la determinación de células viables (UFC/mL) mediante dilución seriada y siembra por profundidad en agar MRS. De los resultados obtenidos se determinó la concentración óptima de FOS para los siguientes análisis.



**Figura 10.** Diagrama para las metodologías de la extracción y cuantificación de fructooligosacáridos, y los análisis microbiológicos de *Cynara scolymus* “alcachofa”.

#### **3.2.8.2 Producción de bacteriocinas**

Se preparó caldo MRS al que se le adicionó la concentración necesaria de sobrenadante (FOS) para alcanzar la concentración óptima y otra de caldo MRS (blanco), a ambos medios se le agregó *Lactobacillus plantarum*. Se realizó controles de pH, absorbancia a 600 nm y unidades formadoras de colonias (UFC) a cada tres horas para evaluar el comportamiento de *Lactobacillus plantarum*. Así mismo, para la obtención de los extractos de bacteriocinas, se trabajó con los extractos de las 15, 18, 24, 36, 42 y 48 horas, se centrifugó 10 mL del cultivo durante 20 minutos a 6000 rpm y a 4 °C, y se procedió a separar el sobrenadante (bacteriocinas) de la biomasa de *Lactobacillus plantarum* mediante filtración por filtros 0.2 um. El sobrenadante se sometió a calentamiento a 80 °C por 10 minutos.

#### **3.2.8.3 Determinación de la actividad antimicrobiana**

De los extractos de bacteriocinas obtenidos, se procedió a realizar la prueba de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.

#### **3.2.8.4 Prueba de actividad antimicrobiana: Método de difusión en agar**

En cada placa petri se colocó 1 mL de inóculo de cepas patógenas (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) a escala de Mac Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias /mL), luego se agregó 20 mL de agar Mueller Hinton (AMH) y se homogenizó el inóculo con

el agar. Una vez solidificado se les realizó pozos de 8 mm, en cada pozo se adicionaron 100 uL del extracto de bacteriocinas obtenido de *Lactobacillus plantarum*, luego se incubó a 37 °C y se determinaron los halos de inhibición. Como controles negativos fueron caldo MRS y como control positivo el antibiótico Gentamicina (10 ug).<sup>62</sup>

### **3.2.8.5 Evaluación fisicoquímica de las bacteriocinas**

#### **a) Sensibilidad a catalasa**

A los sobrenadantes que presentaron actividad antibacteriana y con pH ajustados a 6.5 con NaOH 2.5N, se trataron con una solución de catalasa a una concentración de 2 mg /ml, usando como diluyente de la enzima el buffer fosfato sódico 0.01 M, pH 7.2. Las muestras se incubaron a 37 °C por 1 hora. Después se realizó el ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.

#### **b) Sensibilidad a enzimas**

Los sobrenadantes que presentaron actividad antibacteriana fueron sometidos a un tratamiento con una proteasa (pronasa E), a una concentración final de 2 mg/ml de enzima, usando como diluyente de la enzima el buffer fosfato sódico 0.01 M, pH 7.0. Los sobrenadantes tratados se incubaron a 37 °C por 2 horas. Posteriormente, se determinó la actividad antibacteriana de los sobrenadantes tratados usando la técnica de difusión en agar.

c) Estabilidad térmica

Los sobrenadantes seleccionados con actividad antibacteriana se calentaron en baño de agua a 60 °C, 80 °C y 90 °C por 30 minutos en cada caso. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se determinó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en agar como en los ensayos anteriores.

d) Estabilidad frente al pH

A los sobrenadantes de las muestras activas se les ajustaron el pH a 6.5 con NaOH 2.5 N. Luego del tratamiento, se ensayó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en agar. Se procedió de la misma manera para los valores de pH 7 y 10. La medición de pH se realizó usando un potenciómetro.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Estudio Químico Bromatológico

**Tabla 4.** Composición Químico Bromatológico de *Cynara scolymus* “alcachofa” en muestra fresca y muestra seca.

COMPONENTES	Muestra seca	Muestra fresca
Humedad (g%)	---	80.00
Cenizas (g%)	7.21	---
Proteína total (g%)	9.01	---
Fibra cruda (g%)	6.18	---
Grasa (g%)	0.54	---
Azúcares reductores directos (g% glucosa)	8.89	
Azúcares reductores totales (g% glucosa)	22.79	---
pH	6.5	---

### 4.2. Extracción y determinación de fructooligosacáridos

En la Tabla 5 se muestra las cantidades de fructooligosacáridos (FOS) obtenidos a temperaturas de 60 °C (por 60 min) y 80 °C (por 45 minutos).

**Tabla 5.** Contenido de Fructooligosacáridos (FOS) en *Cynara scolymus* “alcachofa”.

	Temperatura					
	60 °C			80 °C		
<b>Tiempo</b>	60 minutos			60 minutos		
<b>N° Tratamiento</b>	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<b>FOS (g%)</b>	2,01	2,04	2,11	5,56	5,37	5,56
<b>Promedio</b>	2.05 g%			5.50 g%		
<b>Desviación estándar</b>	0.05			0.11		
<b>Contenido de FOS</b>	2,04 ± 0,05 <sup>a</sup>			5,50 ± 0,11 <sup>a</sup>		
Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	SC	CM	Relación F		
				Calculada	Tabular (p≤0,05)	
Total (T)	5					
Entre muestras	1	17.785	17.785	2425.202	6.608	
Intra muestras	4	0.029	0.007	0.000	5.192	

En esta tabla se evidencia que hay diferencia significativa entre la cantidad de FOS (g%) obtenido a 60°C y 80°C, pero no dentro de los valores obtenidos en cada temperatura. T: Tratamiento; (a): Desviación estándar

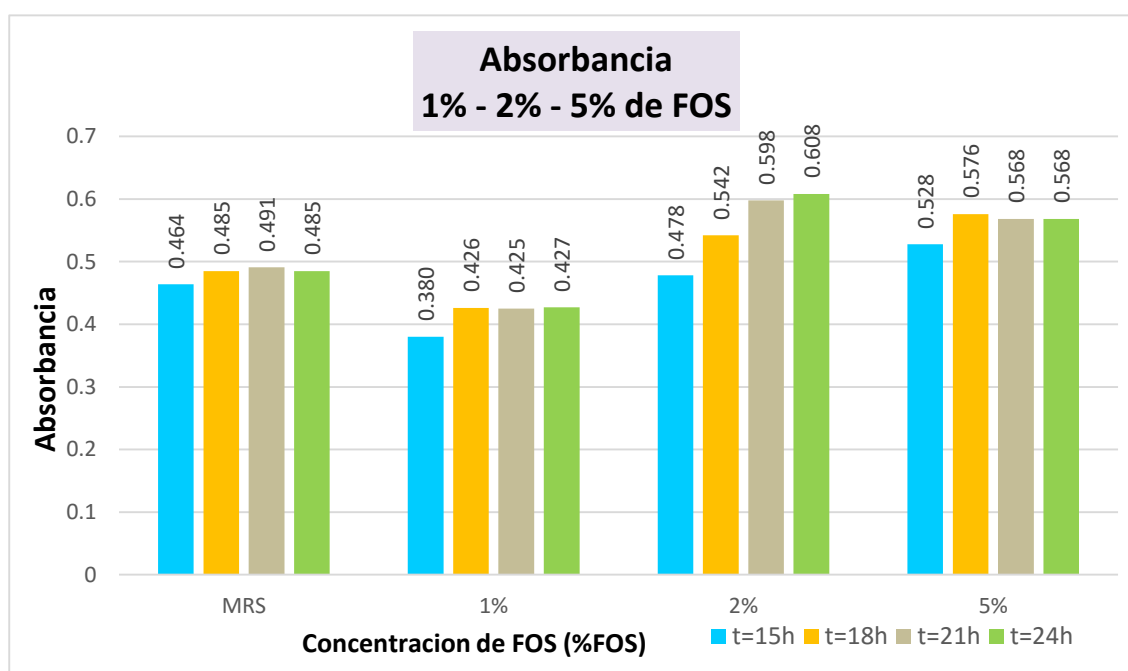
### 4.3. Análisis microbiológicos

#### 4.3.1. Efecto de los FOS sobre la población de *Lactobacillus plantarum*

En la figura 11 se observa la evaluación de la absorbancia por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* en la población de *Lactobacillus*; en la figura 12 la evaluación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *L. plantarum* por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* y en la figura 13 la evaluación de pH por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* en la población de *Lactobacillus plantarum*.

**Tabla 6.** Evaluación de la absorbancia por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* “alcachofa” sobre la población de *Lactobacillus*.

ABSORBANCIA ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ )					
[% FOS]	Tiempo de incubación (horas)				
	t = 0 h	t = 15 h	t = 18 h	t = 21 h	t = 24 h
MRS (Blanco)	0	0.464	0.485	0.491	0.485
1% FOS	0	0.38	0.426	0.425	0.427
2% FOS	0	0.478	0.542	0.598	0.608
5% FOS	0	0.528	0.576	0.568	0.568

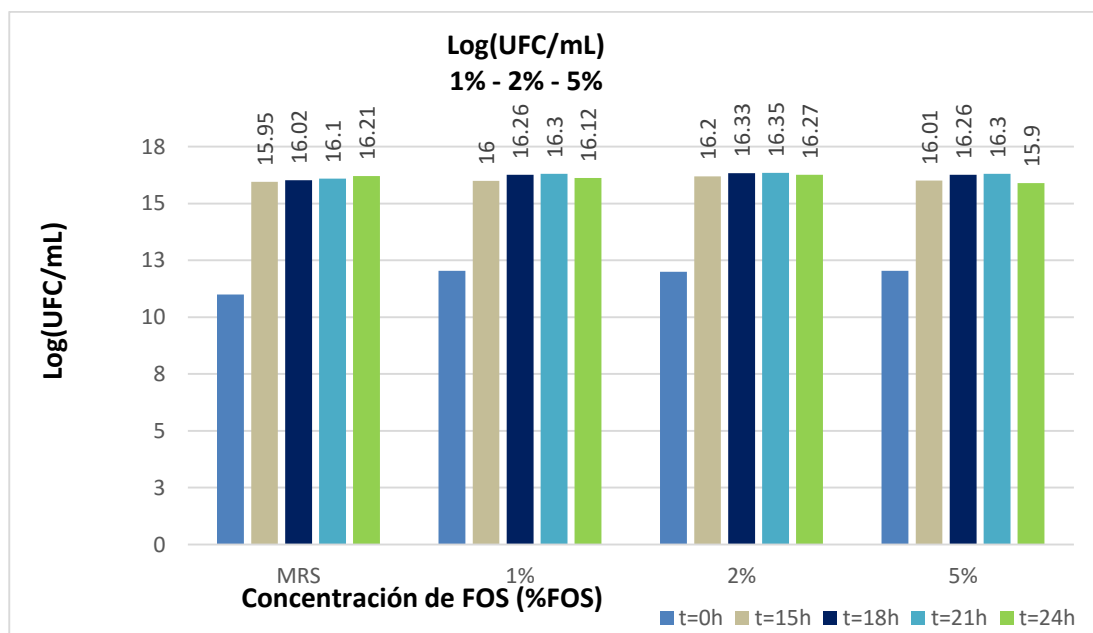


**Figura 11.** Evaluación de la absorbancia por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* sobre la población de *Lactobacillus*.

**Tabla 7.** Evaluación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de *L. plantarum* por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* “alcahofa”.

[% FOS]	Log (UFC/mL)(*)				
	Tiempo de incubación (horas)				
	t = 0 h	t = 15 h	t = 18 h	t = 21 h	t = 24 h
MRS (blanco)	11.00	15.95	16.02	16.10	16.21
1% FOS	12.04	16.00	16.26	16.30	16.12
2% FOS	12.00	16.20	16.33	16.35	16.27
5% FOS	12.04	16.01	16.26	16.30	15.90

(\*) En la tabla se muestra los valores promedio obtenidos.



**Figura 12.** Evaluación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *L. plantarum* por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus*



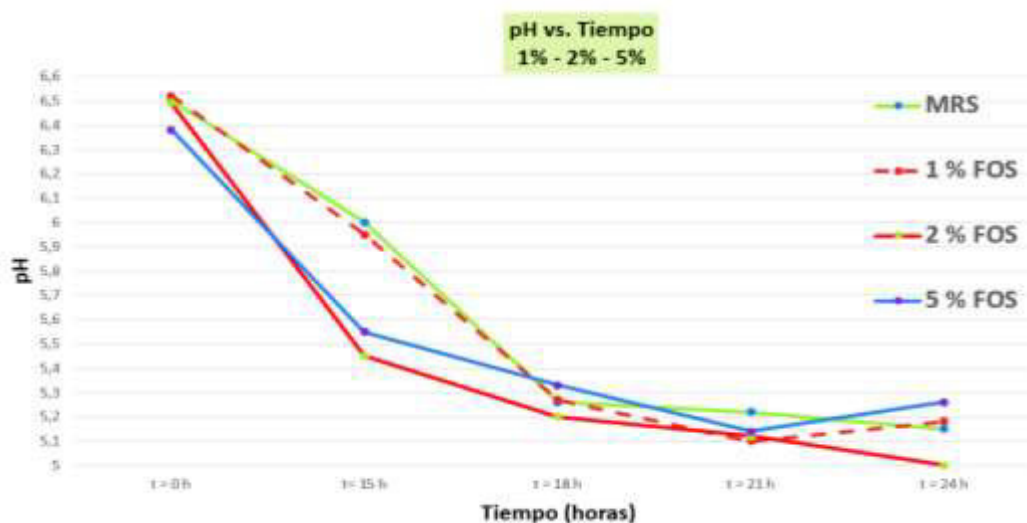
**Tabla 8.** Efecto de los fructoligosacáridos (2 %) sobre la población de *Lactobacillus plantarum* a las 21 y 24 horas

t	Log (UFC/mL)		Log (UFC/mL)		Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	SC	CM	Relación F	
	2 %	PROMEDIO	MRS	PROMEDIO					Calculada	Tabular (p≤0,05)
21 horas	16.35	16.35	16.10	16.31	Total (T)	5				
	16.36		16.11		Entre muestras	1	0.096	0.096	1444.000	6.608
	16.35		16.09		Intra muestras	4	0.000	0.000	0.001	5.192
24 horas	16.26	16.27	16.21	16.21	Total (T)	5				
	16.28		16.21		Entre muestras	1	0.006	0.006	90.250	6.608
	16.28		16.21		Intra muestras	4	0.000	0.000	0.011	5.192

En la tabla se observa que hay diferencias significativas del efecto de FOS (2 %) a las 21 horas y a las 24 horas, con respecto al medio MRS.

**Tabla 9.** Evaluación de pH por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* “alcachofa” sobre la población de *Lactobacillus*.

pH					
[% FOS]	Tiempo de incubación (horas)				
	t = 0 h	t = 15 h	t = 18 h	t = 21 h	t = 24 h
MRS (Blanco)	6.5	6.00	5.26	5.22	5.15
1% FOS	6.52	5.95	5.27	5.10	5.18
2% FOS	6.49	5.45	5.20	5.12	5.00
5% FOS	6.38	5.55	5.33	5.14	5.26



**Figura 13.** Evaluación de pH por efecto de diferentes concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* sobre la población de *Lactobacillus*.

#### 4.3.2 Producción de bacteriocinas

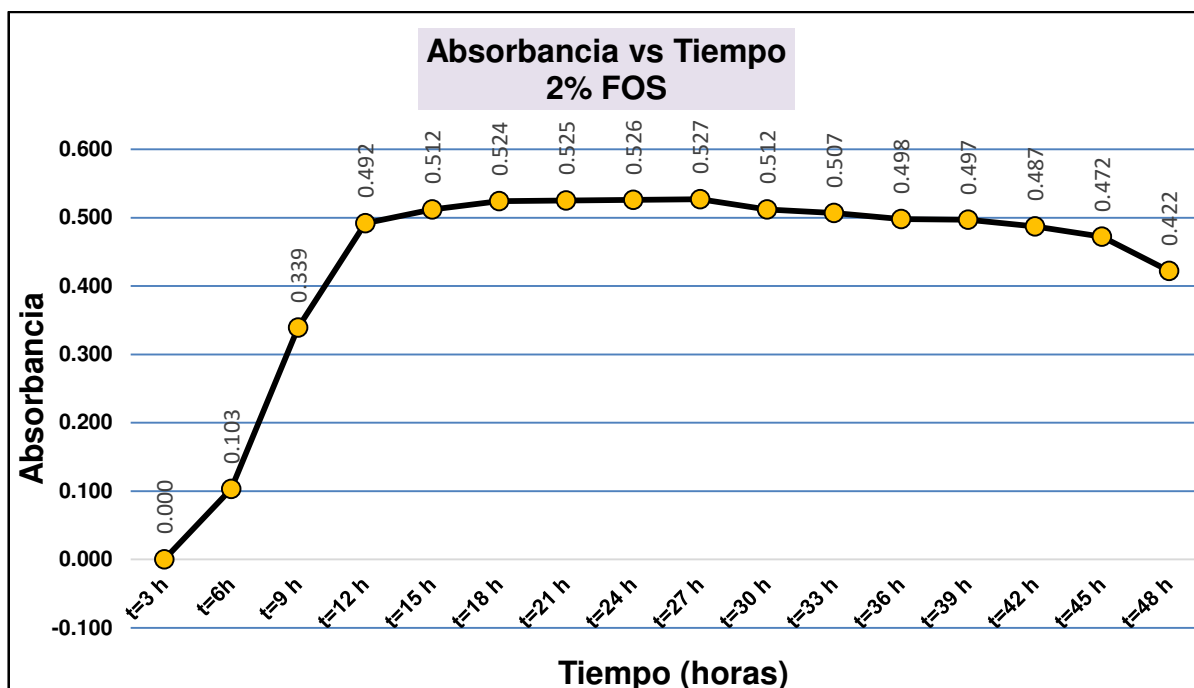
Se obtuvieron bacteriocinas entre las 24 y 36 horas, lo cual se vio en la actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y en la evaluación fisicoquímica (pH, estabilidad térmica, sensibilidad a enzimas y prueba de catalasa) a las cuales fueron sometidas dichas bacteriocinas.

#### 4.3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana

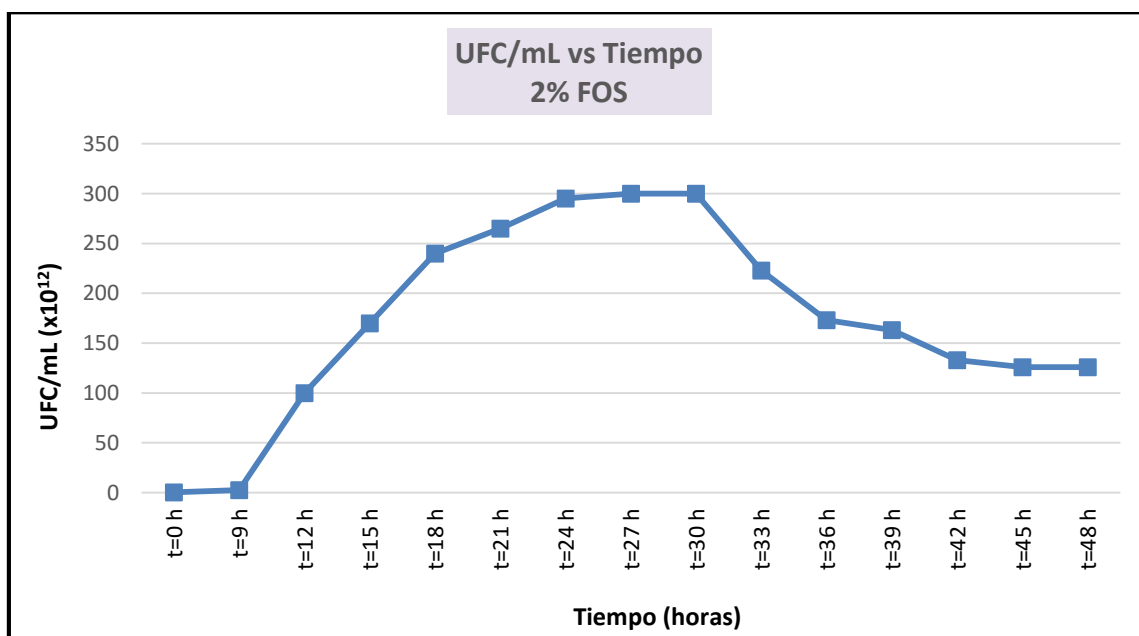
La actividad antimicrobiana se trabajó con la concentración óptima de FOS, concentración con la que hubo mayor influencia sobre la población de *Lactobacillus plantarum*. Dicha concentración fue del 2 % de FOS. En la tabla 9 se muestra los valores obtenidos de Absorbancia (600 nm), UFC/mL y pH cada tres horas durante 48 horas.

**Tabla 10.** Evaluación de absorbancia, UFC y pH por efecto de 2% de FOS de *Cynara scolymus* sobre la población de *Lactobacillus*.

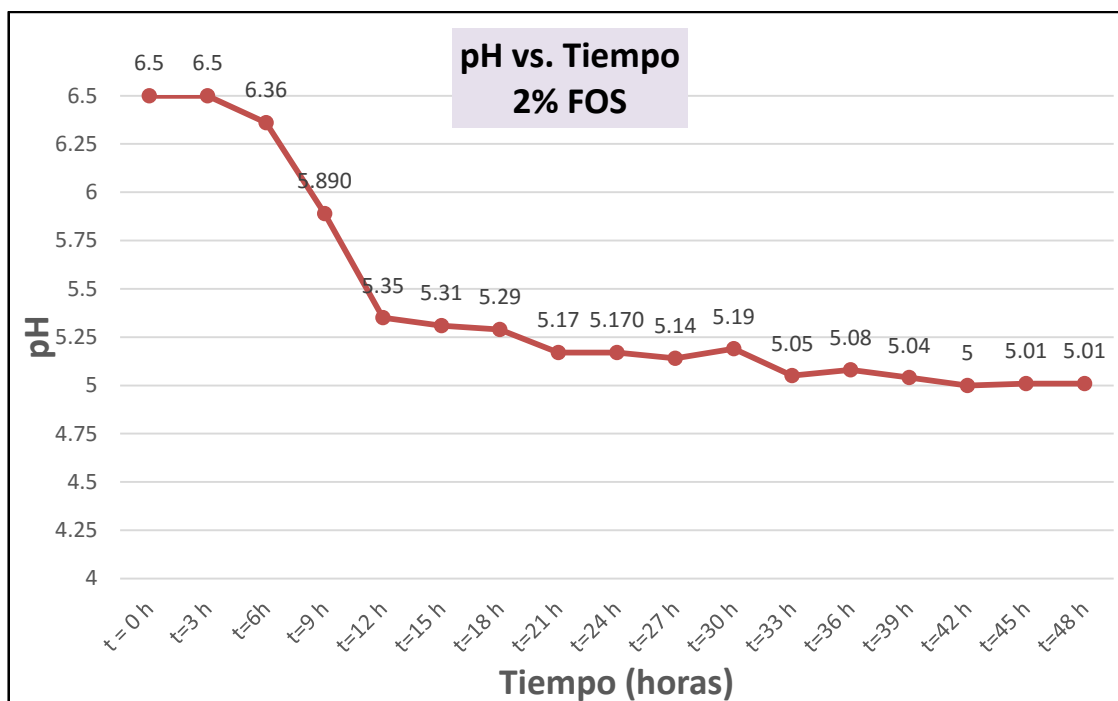
Concentración al 2%			
Tiempo	ABS	UFC/mL	pH
T=0 h	---	---	6.50
t =3 h	0	---	6.50
t = 6 h	0.103	0.25 x10 <sup>15</sup>	6.36
t = 9 h	0.339	2.51 x10 <sup>14</sup>	5.89
t = 12 h	0.492	10.0 x10 <sup>15</sup>	5.35
t = 15 h	0.512	17.0 x10 <sup>15</sup>	5.31
t = 18 h	0.524	24.0 x10 <sup>15</sup>	5.29
t = 21 h	0.525	26.2 x10 <sup>15</sup>	5.17
t = 24 h	0.526	26.2 x10 <sup>15</sup>	5.17
t = 27 h	0.527	30.0 x10 <sup>15</sup>	5.14
t = 30 h	0.512	30.0 x10 <sup>15</sup>	5.19
t = 33 h	0.507	22.3 x10 <sup>15</sup>	5.05
t = 36 h	0.498	17.3 x10 <sup>15</sup>	5.08
t = 39 h	0.497	16.3 x10 <sup>15</sup>	5.04
t = 42 h	0.487	13.3 x10 <sup>15</sup>	5.00
t = 45 h	0.472	12.6 x10 <sup>15</sup>	5.01
t = 48 h	0.422	12.6 x10 <sup>15</sup>	5.01



**Figura 14.** Evaluación de absorbancia y tiempo por efecto de 2% de concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* sobre la población de *Lactobacillus*.



**Figura 15.** Evaluación de UFC y tiempo por efecto de 2% de concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* sobre la población de *Lactobacillus*.



**Figura 16.** Evaluación de pH y tiempo por efecto de 2% de concentraciones de FOS de *Cynara scolymus* sobre la población de *Lactobacillus*.

#### 4.3.4 Prueba de actividad antimicrobiana: Método de difusión en agar

En las siguientes tablas se muestran los promedios de los halos de inhibición del extracto de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* en diferentes tiempos, frente a bacterias patógenas como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, así mismo, se muestran las desviaciones estándar y la prueba estadística de Fisher.

**Tabla 11.** Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de *L. plantarum* frente al microorganismo patógeno *Escherichia coli*.

Tiempo (h)	Halos de inhibición (mm)		Promedio ± desv.est.	Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	SC	CM	RELACIÓN F	
	FOS	MRS						Calculada	Tabular (p≤0,05)
24 horas	14	12	14.3 ± 0.58	Total (T)	5				
	14	12		Entre muestras	1	10.667	10.667	32.000	6.608
	15	11		Intra muestras	4	1.333	0.333	0.031	5.192
36 horas	12	10	12.7 ±0.58	Total (T)	5				
	13	9		Entre muestras	1	13.500	13.500	40.500	6.608
	13	10		Intra muestras	4	1.333	0.333	0.025	5.192

En esta tabla se evidencia que hay diferencia significativa entre los valores de halos de inhibición de las bacteriocinas con FOS y MRS (blanco), tanto a las 24 horas y a las 36 horas.

Halo de inhibición de Gentamicina =  $21.67 \pm 0.58$

**Tabla 12.** Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de *L. plantarum* frente al microorganismo patógeno *Staphylococcus aureus*

Tiempo (h)	Halos de inhibición (mm)		Promedio ± desv.est.	Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	SC	CM	Relación F	
	FOS	MRS						Calculada	Tabular (p≤0,05)
24 horas	14	10	13.7 ± 0.58	Total (T)	5				
	14	12		Entre muestras	1	10.667	10.667	16.000	6.608
	13	11		Intra muestras	4	2.667	0.667	0.062	5.192
36 horas	11	11	12.0 ± 1.73	Total (T)	5				
	11	10		Entre muestras	1	0.667	0.667	2.000	6.608
	12	11		Intra muestras	4	1.333	0.333	0.500	5.192

En esta tabla se evidencia que hay diferencia significativa entre los valores de halos de inhibición de las bacteriocinas con FOS y MRS (blanco), a las 24 horas, pero no a las 36 horas. Halo de inhibición de Gentamicina =  $19.33 \pm 0.58$

**Tabla 13.** Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de *L. plantarum* frente al microorganismo patógeno *Bacillus subtilis*.

Tiempo (h)	Halos de inhibición (mm)		Promedio ± desv.est.	Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	SC	CM	Relación F	
	FOS	MRS						Calculada	Tabular (p≤0,05)
24 horas	12	10	12.3 ± 0.58	Total (T)	5				
	12	11		Entre muestras	1	4.167	4.167	12.500	6.608
	13	11		Intra muestras	4	1.333	0.333	0.080	5.192
36 horas	11	9	11.0 ± 1.00	Total (T)	5				
	12	10		Entre muestras	1	4.167	4.167	6.250	6.608
	10	9		Intra muestras	4	2.667	0.667	0.160	5.192
42 horas	9	9	9.3 ± 0.58	Total (T)	5				
	9	9		Entre muestras	1	0.167	0.167	1.000	6.608
	10	9		Intra muestras	4	0.667	0.167	1.000	5.192

En esta tabla se evidencia que hay diferencia significativa entre los valores de halos de inhibición de las bacteriocinas con FOS y MRS (blanco) a las 24 horas, pero no a las 36 horas y 42 horas. Halo de inhibición de Gentamicina =  $16.00 \pm 1.00$

**Tabla 14.** Diámetros de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) de las bacteriocinas de *L. plantarum* frente al microorganismo patógeno *Pseudomonas aeruginosa*

Tiempo (h)	Halos de inhibición (mm)		Promedio ± des.est.	Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	SC	CM	Relación F	
	FOS	MRS						Calculada	Tabular (p≤0,05)
15 horas	10	10	10.0	Total (T)	5				
	10	9	±	Entre muestras	1	0.167	0.167	1.000	6.608
	10	10	0.00	Intra muestras	4	0.667	0.167	1.000	5.192
18 horas	12	11	12.0	Total (T)	5				
	12	12	±	Entre muestras	1	0.667	0.667	4.000	6.608
	12	11	0.00	Intra muestras	4	0.667	0.167	0.250	5.192
24 horas	14	11	13.0	Total (T)	5				
	12	11	±	Entre muestras	1	8.167	8.167	12.250	6.608
	13	10	1.00	Intra muestras	4	2.667	0.667	0.082	5.192
36 horas	11	8	11.0	Total (T)	5				
	12	10	±	Entre muestras	1	6.000	6.000	6.000	6.608
	10	9	1.00	Intra muestras	4	4.000	1.000	0.167	5.192

En esta tabla se evidencia que hay diferencia significativa entre los valores de halos de inhibición de las bacteriocinas con FOS y MRS (blanco) a las 24 horas, pero no a las 15, 18 y 36 horas. Halo de inhibición de Gentamicina =  $19.33 \pm 1.15$

#### 4.3.5 Evaluación fisicoquímica de las bacteriocinas

Se observa en la tabla 14 las evaluaciones fisicoquímicas de sensibilidad a catalasa, sensibilidad a enzima, la estabilidad térmica y frente al pH de las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum*, utilizando el microorganismo *Escherichia coli* como microorganismo patógeno.

**Tabla 15.** Halos de inhibición obtenidos en las pruebas de evaluación fisicoquímica de bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum*.

Prueba	Sensibilidad a Catalasa	Sensibilidad a enzima	Estabilidad térmica			pH		
Diámetro de Halo (mm)	14	NP	60 °C	80 °C	90 °C	6.5	7	10
			14	13	10	14	9	NP



## V. DISCUSIÓN

En el estudio químico bromatológico de *Cynara scolymus* “alcachofa” (Tabla 2), se obtiene 80.00 g% de humedad, 7.21 g% de cenizas, 9.01 g% de proteínas, 6.18 g% de fibra cruda; valores algo similares a lo reportado por Lutz<sup>13</sup>, quien obtuvo valores de 76.60 g%, 7.06 g%, 15.96 g% y 65.82 g%, respectivamente. El contenido de azúcares reductores directos (ARD) y totales (ART) en *Cynara scolymus* es de 8.89 y 22.79, respectivamente.

El agua es casi universalmente el solvente utilizado para la extracción de diversas sustancias presentes en las plantas, sumado a ello, las condiciones de temperatura, agitación, entre otras. La extracción de fructooligosacáridos (FOS) depende del tipo de solvente a utilizar, como puede ser el agua, mezcla acetona agua (50% v/v), acetona, etc., agitación<sup>59</sup>, por el tiempo de extracción, temperatura de maceración y la hidratación del sólido<sup>60</sup>, así mismo, en el presente proyecto, la extracción se basó en la solubilidad de los FOS en el agua, la dispersión (relación sólido/agua) que permitió una hidratación adecuada fue 1:10; por otra parte se obtuvo que la mejor temperatura de maceración fue de 80° C (frente a 60 ° C por 1 hora) por 1 hora. En la tabla 3 se muestra el contenido de FOS en *Cynara scolymus* “alcachofa” con valores de 2,04 g% (extraído a 60°C) y 5,50 g% (extraídos a 80°C), mucho menor a los reportados por Moharib en el 2014<sup>61</sup>, cuyo valor es 42,22 g%, sin embargo, mucho mayor que los reportados por Valderrama, quien menciona que la alcachofa contiene menos de 1 % de fructtoligosacáridos.<sup>62</sup>

El efecto de los FOS (1%, 2% y 5% de concentración en el medio) se observa en la tabla 6 y figura 11, donde la absorbancia (600 nm) aumenta conforme

aumentan las horas de cultivo, siendo las máximas absorbancias con una concentración de 2 % de FOS en el medio, siendo mayores que las obtenidas en el medio formado solo por MRS, y mayores también que las obtenidas en las otras concentraciones (1 % y 5%); entre tanto, en la tabla 7 y figura 12, los valores obtenidos de UFC/mL de *L. plantarum* muestran que el efecto de los FOS a 2% (incrementando su número de  $0.010 \times 10^{14}$  a  $18,8 \times 10^{15}$  UFC/mL) es mucho mayor a lo obtenido en el medio formado solo por MRS, así mismo, es mayor que las otras dos concentraciones de FOS (1% y 5%), con respecto al variación del pH se observa una disminución conforme pasa el tiempo, así como lo menciona<sup>63</sup>.

El crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, según la absorbancia obtenida como se observa en la tabla 10 y figura 14, es máximo entre las 12 y 27 horas, con ligera disminución desde las 27 horas hasta las 48 horas, según Agudelo<sup>64</sup>, la fase exponencial termina a las 24 horas de incubación, a partir de ella, se inicia un periodo de estacionaria hasta las 48 horas; desde las 27 horas, la absorbancia empieza a disminuir, mientras que en función de las UFC/mL, se observa en la tabla 9 y figura 16, hay un máximo número de UFC entre las 18 horas y las 30 horas, disminuyendo conforme pasa el tiempo.

Las condiciones del medio, por ejemplo, la temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes cumple un papel crucial en la producción de bacteriocinas, por lo tanto, la actividad antimicrobiana.<sup>65</sup>

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum*, en un medio que contenía 2 % de FOS, es diferente para cada microorganismo patógeno. Se observa actividad antimicrobiana entre las 15 y 36 horas, pero solo hubo diferencia significativa con respecto al blanco a las

24 horas (excepto en *Escherichia coli* que también hubo diferencia significativa a las 36 horas), a las 36 horas ya se observa una disminución, ello debido a que la producción de bacteriocinas depende de la fase de crecimiento y, para el caso de *Lactobacillus plantarum*, la producción de bacteriocinas tiene un máximo a las 12 horas, y ésta se mantiene constante durante 12 horas, decreciendo desde las 27 horas (empieza a decaer una vez comienza la fase estacionaria).<sup>66</sup>

El extracto de bacteriocinas muestra un efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que los estudios evidencian de que las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marcescens*, etc.)<sup>66,67</sup>, además, el efecto que ejercen sobre los microorganismos patógenos es distinto, debido a la distinta sensibilidad y/o resistencia de cada microorganismo.<sup>68</sup>

Para la evaluación fisicoquímica de las bacteriocinas, estas se realizan en función de sus características, en primer lugar, todas las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron a pH 6.5 con la finalidad de descartar que dicho efecto se deba a los ácidos orgánicos que pudiera producir *Lactobacillus plantarum*, además la tabla 15 muestra que la actividad de la actividad antimicrobiana no se ve afectada frente a la prueba de sensibilidad a catalasa, lo que demuestra que la actividad antimicrobiana no es debida a la producción de peróxido de hidrógeno<sup>69</sup>, así mismo, se observa que es estable y aún presenta actividad antimicrobiana cuando es sometido a calentamiento a 60°C

y 80°C durante 30 minutos tal como reporta Cristóbal<sup>70</sup>, con lo cual se evidencia la estabilidad térmica de las bacteriocinas a ciertas temperaturas<sup>70</sup>, aunque se observa una ligera disminución en el tratamiento de 90°C, en la prueba de sensibilidad a la enzima proteasa, no se observa halo de inhibición, debido a la naturaleza proteica de las bacteriocinas, son inactivadas por el tratamiento con proteasas (pronasa, peptidasa, tripsina, etc).<sup>69</sup>; así mismo, se observa que en  $\text{pH} = 6,5$  hay actividad, mientras que a  $\text{pH} = 7$  y  $\text{pH} = 10$  no se muestra ninguna actividad, ello debido a que las bacteriocinas poseen actividad en medios ácidos, mientras que no se registra actividad a  $\text{pH}$  neutro o alcalinos.<sup>67,69,71</sup>

## VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo una mayor extracción de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* “alcachofa” fue mayor a 80 °C, durante 60 minutos y con una proporción sólidos:agua de 1:10, así mismo, el contenido de fructooligosacáridos presentes en *Cynara scolymus* “alcachofa” es de 5.50  $\pm$  0.11 g%.
2. Los fructooligosacáridos (FOS) de *Cynara scolymus* “alcachofa” en una concentración del 2 % tienen un efecto significativo positivo sobre el crecimiento de la población de *Lactobacillus plantarum*, a las 21 horas y 24 horas.
3. Los fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* adicionados en una concentración de 2 % a los medios de cultivo de *Lactobacillus plantarum* favorece la producción de bacteriocinas.
4. Las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* presentan actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en los ensayos del método de difusión en agar.

## RECOMENDACIONES

1. Identificar los tipos de fructooligosacáridos presentes en *Cynara scolymus* “alcachofa”.
2. Se recomienda realizar pruebas de actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos patógenos y ver la actividad que presentarían las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum*.
3. Así mismo, identificar las bacteriocinas que produce *Lactobacillus plantarum*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jenssen H, Hamill P, Hancock R. Peptide Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 491 – 511.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Glosario de Biotecnología para la agricultura y la alimentación. Roma; 2004.
3. García P, Velasco C. Evolución del conocimiento de la fibra. Nutr Hosp. 2007; 22(2): 20 – 25.
4. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías Prácticas: Probióticos y Prebióticos. 2008.
5. García T. Industrialización integral de la alcachofa en pasta nutricional y para alimentos balanceados. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial – UNMSM. 2008; 11(1): 37 – 46.
6. Rodríguez JN. Aprovechamiento de residuos de alcachofa [monografía en internet]. Murcia: Universidad de Murcia. 2009 [acceso 15 de enero de 2016]. Disponible en:  
  
<https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6303/1/Aprovechamiento%20de%20Residuos%20de%20Alcachofa-Aspectos%20Teoricos.pdf>
7. Bruneton J. Farmacognosia – Fitoquímica, plantas medicinales. 2ª ed. Zaragoza: Acribia S.A.; 2001.
8. Serrano Z. La alcachofa. 1ra ed. España: Junta de Andalucía; 2006.
9. Gamarra MM. La estructura de los costos de exportación de la alcachofa en conserva hacia los mercados internacionales – Región La Libertad –

- año 2012. [tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Económicas. 2014.
10. Ministerio de agricultura: Dirección General de Competitividad Agraria Alcachofa - Perú – Un campo fértil para sus inversiones y el desarrollo de sus exportaciones. [acceso 10 de diciembre de 2015]. Disponible en: [http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/alcachofa/alcachofa\\_feb11.pdf](http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/alcachofa/alcachofa_feb11.pdf)
  11. Fundación Española de Nutrición [página principal en internet]. España: Avila JM, Estalrich P. [acceso 10 de diciembre de 2015]. Las alcachofas. Disponible en: [http://www.fen.org.es/ac\\_firma\\_ficha.asp?pag=2&indice=01&idFirma=30](http://www.fen.org.es/ac_firma_ficha.asp?pag=2&indice=01&idFirma=30)
  12. Gaafar AA, Salama ZA. Phenolic Compounds from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts and their Antimicrobial Activities. J Biol Agric Health. 2013; 3(12): 1 – 7.
  13. Lutz M, Henríquez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. J Food Compost Anal. 2011; 24: 49 – 54.
  14. Fonnegra Gómez RJ, Jiménez Ramírez SL. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2ª ed. Medellín: Universidad de Antioquia; 2007.
  15. Huige L, Ning X, Isolde B, Ying Y, Ulrich F. Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Up-Regulate Endothelial-Type Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Human Endothelial Cells. J Pharmacol Exp Ther. 2004; 310 (3): 926 – 932.



16. Cruzado M, Pastor A, Castro N, Cedrón JC. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa. *Rev Soc Quím Perú*. 2013; 79(1): 57 – 63.
17. Vargas CG. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas de agave mescalero potosino (*Agave salmiana*). [Tesis para optar el grado de maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable]. Jiquilpan: Instituto Politécnico Nacional; 2009. 102 p.
18. Ramírez A. Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. [Trabajo para obtener el título de Maestro en Ciencias en Bioprocesos]. Instituto Politécnico Nacional; 2010. 75 p.
19. Pérez D, López G, Ros G. Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. Murcia: Universidad de Murcia. 2004. [acceso 15 de marzo de 2016].
20. Gómez JC, Zúñiga M, Silva E, Ospina S. Producción de fructooligosacáridos (FOS) por tecnología de enzimas. Parte I: Evaluación de aislados nativos de hongos para la producción de FOS. *Rev Col Cienc Quím Farm*. 2005; 34(1):77 – 91.
21. Lorenzoni AS, Aydos LF, Klein MP, Rodrigues RC, Hertz PF. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$  – fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydr Polym*, Elsevier. 2014; 103: 193 – 197.
22. González LH. Obtención de nutraceuticos presentes en la piña del agave tequilero mediante dilución diferencial. [tesis para obtener el grado de

- maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable]. Jiquilpan: Instituto Politécnico Nacional; 2013. 80 p.
23. Chacón A. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS). *Agron Mesoam*. 2006; 17(2): 265 – 286.
24. Jiménez ME, Sammán N. Caracterización química y cuantificación de fructooligosacáridos, compuestos fenólicos y actividad antirradical de tubérculos y raíces andinos cultivados en el noroeste de Argentina. *Arch Latinoam Nutr*. 2014; 64 (2): 131 – 138.
25. Escudero E, Gonzalez P. La fibra dietética. *Nutr. Hosp*. 2006; (2): 61 – 72.
26. The Vegetarian Resource Group Blog [Internet]. Baltimore; 2012 [acceso 20 de marzo de 2015]. Jeanne Yacoubou. Oligofructose and fructooligosaccharides (FOS): Derived mostly from chicory root or cane sugar. Disponible en: <http://www.vrg.org/blog/2012/10/22/oligofructose-and-fructooligosaccharides-fos-derived-mostly-from-chicory-root-or-cane-sugar/>
27. Mellado E, López MG. Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chem*. 2015; 167: 349 – 357.
28. Oliveira G, Gonzáez I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp*. 2007; 22(2): 26 – 34.
29. Lavanda I, Isay SM, Rodrigues A, Colli C. Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. *Rev Nutr*. 2011; 24(2): 333 – 344.
30. Hernández P, Jiménez MT. Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructooligosacáridos. Puebla: Universidad de las Américas. 2010 [acceso 02 de enero de 2016]. Disponible en:

[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Hernandez-Carranza-et-al-2010.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Hernandez-Carranza-et-al-2010.pdf)

31. Costa GT, Abreu GC, Guimarães AB, Leitão PR, Guimarães SB. Fructooligosaccharide effects on serum cholesterol levels. An overview. *Acta Cir Bras.* 2015; 30(5): 366 – 3770.
32. Paineau D, Respondek F, Menet V, Sauvage R, Bornet F, Wagner A. Effects of short-chain fructooligosaccharides on faecal bifidobacteria and specific immune response in formula-fed term infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2014; 60(3): 167 – 175.
33. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma; 2006
34. Martínez M, Pacheco S, Vicario S. Probióticos: Potencial para prevenir y curar. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 2007; 1(2): 573 – 583.
35. Conte CA. Estudio del potencial probiótico de cepas bacterianas de distinta procedencia. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. España, 2014.
36. Ghanbari M, Jami M. Lactic Acid Bacteria and their bacteriocins: A promising approach to seafood biopreservation. In: Kongo M. Lactic acid bacteria – R&D for food, health and livestock purposes. 1<sup>ª</sup> ed. 2013. p 381 – 404.

37. Amorocho CM. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de oveja Guirra. [tesis doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia; 2011. 253 p.
38. Cristóbal RL. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. [Tesis para optar el grado de magister en Microbiología] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú, 2008.
39. Vásquez SM, Suárez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Rev Chil Nutr. 2009; 36(1): 64 – 71.
40. Todorov SD, Vaz Velho M, Gibbs P. Comparison of two methods for purification of plantaricina ST31, A bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. Braz J Microbiol. 2004; 35: 157 - 160.
41. Vallejo M, Ledesma P, Anselmino L, Marguet E. Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56. Rev Colomb Biotechnol. 2014; 16(2): 174 – 179.
42. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol. 2007; 13: 194 – 199.
43. Yang S, Lin C, Sung C, Fang J. Antibacterial activities of bacteriocins: applications in foods and pharmaceuticals. Front Microbiol. 2014; 5 (241): 1 - 10.
44. López JE, Ochoa A, Santoyo G, Anaya JL, Medina E, Martínez M, Loeza PD. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de

- nuevos tratamientos biomédicos. Rev Mex Cienc Farm. 2008; 39(3): 49 – 57.
45. Egan K, Field D, Rea M, Ross RP, Hill C, Cotter P. Bacteriocins: Novel solutions to age old spore – related problems?. Front in Microbiol. 2016; (7): 1 – 21.
46. Chan WC, Dodd HM, Horn N, Maclean K, Lian LY, Bycroft BW, et al. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic Nisin: Role of dehydroalanine. Appl Environ Microbiol. 1996; 62 (8): 2966 – 2969.
47. Sánchez J. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de Enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyr gynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. [Tesis doctoral] Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008. 281 p.
48. Reviriego C. *Lactococcus lactis* productores de pediocina PA-1 y *Enterococcus* aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. España, 2009. 286 p.
49. Oppegard C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Meyer JN. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. J Mol Microbiol Biotechnol. 2007; 13: 210 - 219.
50. Pandey N, Malik RK, Kaushik JK, Singroha G. Gassericin A: a circular bacteriocin produced by Lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. World J Microbiol Biotechnol. 2013; 29: 1977-1987.

51. Alegría A, Delgado S, Roces C, Lopez B, Mayo B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int J Food Microbiol.* 2010; 143: 61 - 66.
52. Meseguer I. Aplicaciones de las halocinas producidas por Arqueas halófilas. *Ciencia e Investigación.* 2005; 8(2): 101 – 106. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v08\\_n2/PDF/a06v8n2.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v08_n2/PDF/a06v8n2.pdf)
53. Florencia M, Fritz R. Potencial use of bacteriocin-like substance in meat and vegetable Food biopreservation. *Int Food Res J.* 2014; 21 (2): 677 - 683.
54. Settanni L, Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 2008; 121: 123 - 138.
55. Lizcano JA, Vergara JL. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora muricata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Colombia, 2008.
56. Rojas JJ, García AM, López AJ. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas.* 2005; 4(2): 28 – 32.
57. AOAC. Official Methods of analysis of the Association Oficial Analitical Chemist. 19<sup>th</sup> ed. 2012.
58. Egan H; Kirt R; Sawyer R. Análisis Químico de los Alimentos de Pearson. Editorial Continental S.A. México. 1991

59. Kurtoglu G, Yildiz S. Extraction of fructo-Oligosaccharide components from banana peels. Gazi University Journal of Science. 2011; 24(4): 877 – 882.
60. Montañez J, Venegas J, Vivar M, Ramos E. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y las hojas del *Agave tequilana* Weber Azul. Bioagro. 2011; 23(3): 199 – 206.
61. Moharib SA, Shehata M, Salama AF, Hegazi MA. Effect of fructooligosaccharides in *Cynara scolymus* and *Allium cepa* on carbohydrate and lipid metabolism in rats. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. 2014; 17(1):
62. Valderrama M. Evaluación de diferentes niveles de alcachofa (*Cynara scolymus*) en dietas para pollos de engorde y su efecto sobre parámetros productivos, alometría del intestino delgado y órganos linfoides. [Tesis]. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Colombia
63. Vegas C, Pichihua BO, Peña C, Zavaleta AI. Efecto simbiótico del extracto de *Smallantus sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. Ciencia e Investigación. 2013; 16(2): 77 – 82.
64. Agudelo C, Ortega R, Hoyos JL. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. Universidad del Cauca. 2010 [acceso 17 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n2/v8n2a02.pdf>
65. Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol. 2007; 13: 194 – 199.

66. Zapata S, Muñoz J, Ruiz O, Montoya O, Gutiérrez P. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. VITAE. 2009; 16 (1): 75 – 82.
67. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology. 2003; 2(8): 219 – 227.
68. Monroy MC, Castro T, Fernández FJ, Mayorga L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. 2009; 73: 63 – 72.
69. Sue L, Philip K, Ajam N. Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. Food Control. 2016; 60: 430 – 439.
70. Cristóbal RL. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú, 2008.
71. Song DF, Yuan M, Gu Q. Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. Plos One. 2014; 9: 1 – 8.



# **ANEXOS**

## 1. EXTRACTO DE BACTERIOCINAS

- a. Extracto de bacteriocinas obtenidos con FOS al 2 % a las 15 h, 18 h, 24 h, 36 h y 48 h.

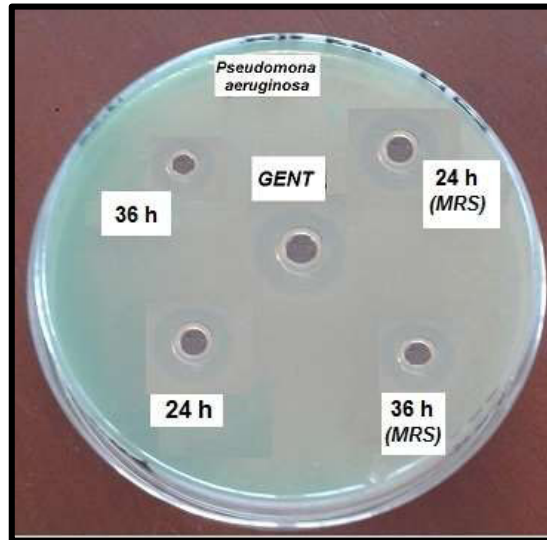


- b. Extracto de bacteriocinas obtenidos en caldo MRS (blanco) a las 15 h, 18 h, 24 h, 36 h y 48 h.

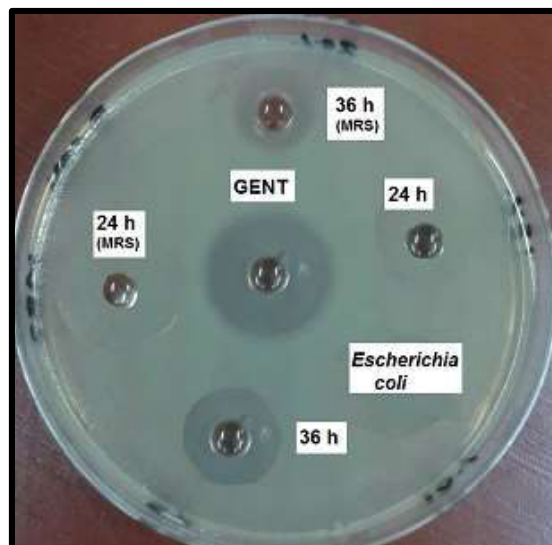


## 2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE BACTERIOCINAS

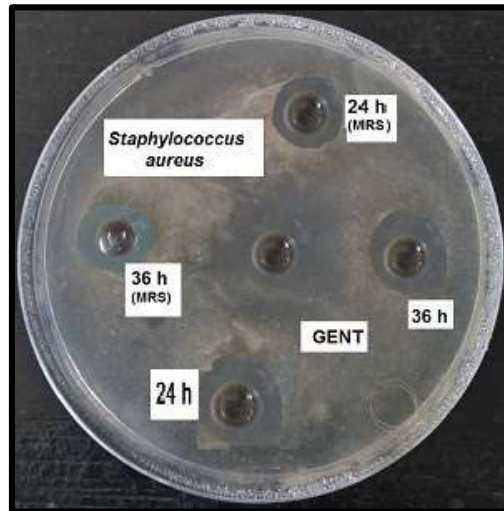
- a. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano de las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* obtenidas con 2% de FOS y MRS (blanco) a diferentes horas para *Pseudomonas aeruginosa*.



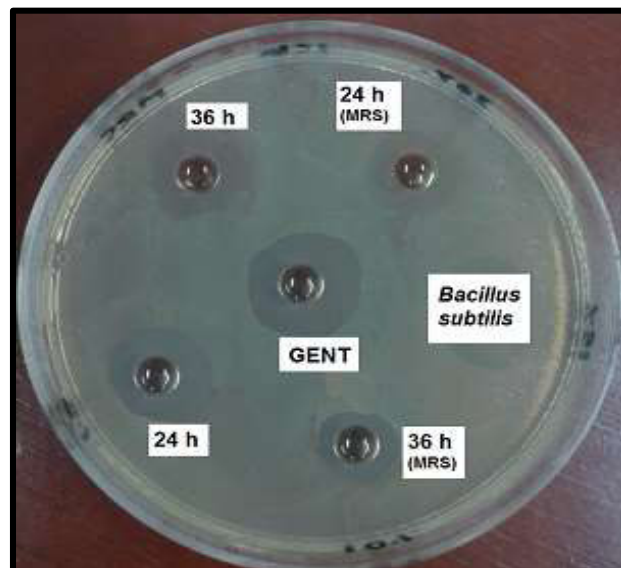
- b. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano de las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* obtenidas con 2% de FOS y MRS (blanco) a diferentes horas para *Escherichia coli*



- c. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano de las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* obtenidas con 2% de FOS y MRS (blanco) a diferentes horas para *Staphylococcus aureus*.



- d. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano de las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* obtenidas con 2% de FOS y MRS (blanco) a diferentes horas para *Bacillus subtilis*.



### 3. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Cynara scolymus*

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b> Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA	
<b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b>		
<hr/>		
<i>"Año de la Consolidación del Mar de Grau"</i>		
<b>CONSTANCIA N° 75-USM-2016</b>		
<p>LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (hojas) recibida de <b>Nicky Rider DELAO LIZARDO</b> estudiante de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: <b><i>Cynara scolymus</i> L.</b> y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).</p>		
<p><b>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</b></p>		
<p><b>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</b></p>		
<p><b>SUBCLASE: ASTERIDAE</b></p>		
<p><b>ORDEN: ASTERALES</b></p>		
<p><b>FAMILIA: ASTERACEAE</b></p>		
<p><b>GENERO: <i>Cynara</i></b></p>		
<p><b>ESPECIE: <i>Cynara scolymus</i> L.</b></p>		
<p>Nombre vulgar: "alcachofa" Determinado por: Mag. Hamilton Beltrán Santiago.</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.</p>		
<p>Lima, 09 mayo de 2016</p>		
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"><div style="text-align: center;"></div><div style="text-align: center;"> <b>Dra. Haydee Montoya Terreros</b> JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</div></div>		